

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Bernard CHOLLOT

Première Thèse

Contribution à l'étude des Associations
entre protéines végétales et Tanins

Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

soutenues le 9 OCT 1963 devant la Commission d'Examen

MM. URION, *Président*

BARRIOL }
CHAPON } *Examineurs*

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555001_0011

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Bernard CHOLLOT

Première Thèse

**Contribution à l'étude des Associations
entre protéines végétales et Tanins**

Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

soutenues le

1963 devant la Commission d'Examen

MM. URION, *Président*

BARRIOL }
CHAPON } *Examineurs*

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1963

Doyen : M. ROUBAULT

Premier Assesseur : M. AUBRY

Deuxième Assesseur : M. VEILLET

Doyens honoraires :

MM. CORNUBERT, DELSARTE, URION

Professeurs honoraires :

MM. GUTTON, CROZE, RAYBAUD, LAFFITTE, LERAY, JOLY, LAPORTE, EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, L. SCHWARTZ, DIEUDONNÉ, DE MALLEMANN, LONGCHAMBON, LETORT, DODE, GAUTHIER, GOUDET, OLMER, CORNUBERT, CHAPELLE, GUÉRIN, CHEVALLIER.

Maîtres de Conférences honoraires :

MM. RAUX, LIENHART

Professeurs :

MM.
URION Chimie biologique
DELSARTE Analyse supérieure
ROUBAULT Géologie
VEILLET Biologie animale
ECHEVIN Botanique
BARRIOL Chimie théorique
BIZETTE Physique
GUILLIEN Electronique
GIBERT Chimie physique
HERVÉ Calcul diff. et intégral
LEGRAS Mécanique rationnelle
DAVID Chimie organique
BOLFA Minéralogie
NICLAUSE Chimie
FAIVRE Physique appliquée
AUBRY Chimie minérale
DUVAL Chimie
COPPENS Radiogéologie
FRUHLING Physique
SUHNER Physique expérimentale

MM.
HILLY Géologie
LE GOFF Génie chimique
CHAPON Chimie biologique
HÉROLD Chimie industrielle
SCHWARTZ Exploitation minière
GAYET Physiologie
MANGENOT Phytopathologie
MALAPRADE Chimie
HADNI Physique
DELAMARE-
DEBOUTEVILLE Zoologie
BONVALET Mécanique physique
M^{me} ROIZEN ... Physique
KERN Minéralogie
BASTICK Chimie
DUCHAUFOUR ... Pédologie
NÉEL Chimie ind. organique
GARNIER Agronomie
WEPPE Minéralogie appliquée
BERNARD Géologie appliquée

Maîtres de Conférences :

MM.

WERNER Botanique
RÉGNIER Physico-chimie
CONDÉ Zoologie
GOSSE Génie chimique
CHAMPIER Physique
GAY Chimie biologique
ROCCI Géologie
VUILLAUME Psychophysiologie
PLAN Mécanique physique

MM.

M^{me} BASTICK .. Chimie M.P.C. (Epinal)
GUDEFIN Physique
HORN Physique
CERF Mathématiques générales
FRENTZ Biologie animale
M^{me} HERVÉ Math. (propédeutiques)
AUROUZE Géologie
FELDEN Physique M.P.C. (Epinal)
N... Physique théor. et nucl.

Chargés d'Enseignement :

MM.

MARI Chimie (I.S.I.N.)
LAFON Physique (I.S.I.N.)
EYMARD Math. (propédeutique)
DANYSZ Mécanique physique
 (I.S.I.N.)

MM.

DEVIOT Physique du solide
DEPAIX Mathématiques
M^{me} HUET Analyse supérieure

Secrétaire Principal : M. CARON.

A MES MAITRES :

M. E. URION,
Doyen Honoraire de la Faculté des Sciences,
Directeur de l'Ecole de Brasserie,
Professeur de Chimie Biologique.

M. L. CHAPON,
Professeur de Chimie Biologique.



En témoignage de ma respectueuse gratitude.

A MES PARENTS,

A MON EPOUSE,

A MES ENFANTS

Ce sujet m'a été proposé par M. le Doyen URION. Je le remercie pour ses encouragements et lui exprime ma profonde gratitude pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la présidence de cette thèse.

Que M. le Professeur CHAPON trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance pour l'aide constante et les conseils éclairés qu'il n'a cessé de me prodiguer au cours de ces recherches effectuées dans son laboratoire à l'Ecole de Brasserie de Nancy. L'excellent esprit d'équipe du laboratoire a largement facilité la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à M. BARRIOL, Professeur de Chimie Théorique, qui a bien voulu faire partie du Jury.

Contribution à l'étude des Associations
entre protéines végétales et Tanins

par

Bernard CHOLLOT

INTRODUCTION

I. — ORIGINE DE NOS TRAVAUX

Les protéines, constituants essentiels de la matière vivante font l'objet de multiples recherches dont le but est la détermination de la structure spatiale, responsable, en particulier, de la spécificité d'action dans le fonctionnement cellulaire.

Les premières recherches, orientées vers le fractionnement et l'isolement d'entités homogènes, avaient mis à profit la précipitation des sols colloïdaux par des sels concentrés à pH contrôlé (salting out) et abouti à un classement sommaire des protéines en quelques grandes familles : albumine, globuline. Puis des techniques physico-chimiques efficaces telles que vitesse de diffusion, ultracentrifugation, électrophorèse, immunoélectrophorèse, chromatographie et diffusion de la lumière, ont permis de dissocier chacune des grandes familles en plusieurs constituants : α , β , γ , δ et de préciser, dans certains cas, la masse et même la forme des particules colloïdales.

Les études physico-chimiques portent presque exclusivement sur des protéines prises à l'état de solution colloïdale. Certaines protéines animales se présentent sous cette forme à l'état naturel ; c'est le cas du sérum sanguin auquel une somme considérable de travaux a été consacrée. Aussi ses constituants protéiques sont maintenant particulièrement bien connus.

Mais on s'est très rapidement aperçu que, dans le domaine des protéines végétales, un même sol, diversement traité, ne subit pas toujours la même résolution α , β , γ , δ souvent quant aux proportions quelquefois quant à la nature. Il en est résulté une progression relativement lente, de nos connaissances, une acquisition nouvelle remettant parfois en question les études précédentes. Dans le cas particulier des graines de céréales, un ensemble de protéines se trouve intimement associé à l'état solide à une foule de corps non protéiques. La mise en solution, opération préalable indispensable à tout fractionnement, met en contact des substances normalement séparées dans les cellules du matériau de départ,

ce qui peut entraîner des réactions imprévues donnant naissance à des associations stables qui n'existaient pas dans la localisation originelle. Par ailleurs, on conçoit fort bien qu'en milieu liquide, sous l'effet de la chaleur et de la tensioactivité ou encore sous l'action de la force ionique μ et du pH, une macromolécule protéique, relativement fragile, subisse des modifications irréversibles, autrement dit soit dénaturée. C'est pour cela que la transposition pure et simple des techniques élaborées pour les protéines animales ne conduit généralement pas à des résultats satisfaisants avec les protéines végétales.

De fait, les premiers travaux entrepris sur proposition de M. le Professeur URION, nous ont montré que les solutions brutes, obtenues par extraction saline d'une farine d'orge, sont constamment souillées par des substances polyphénoliques. Ces dernières s'oxydent à l'air avec une grande rapidité en provoquant des brunissements et sont une des causes de précipitations particulièrement gênantes (1). Les fractions obtenues par saturation progressive au sulfate d'ammonium sont également contaminées par de telles substances. La redissolution des précipités, rarement totale, fait apparaître régulièrement l'irréversibilité partielle des processus utilisés pour la purification. C'est ainsi, par exemple, que les solutions stériles de β globuline même purifiées par plusieurs précipitations en cascade et conservées à l'abri de l'air troublent lentement. L'instabilité des solutions que décèlent avec une grande finesse les techniques d'étude basées sur la diffusion de la lumière, semble assez fréquemment liée à l'existence de substances non protéiques, bien que ces dernières puissent n'exister qu'en quantité infime, et constitue un écueil fort gênant pour une étude approfondie.

Nous sommes donc autorisés à penser que certaines des espèces de plus en plus nombreuses, décrites comme des constituants définis des protéines végétales pures pourraient n'être que des artéfacts suscités par la mise en solution.

Il nous est donc apparu indispensable de préciser d'abord les causes de l'instabilité des solutions de protéines végétales avant de pouvoir aborder les problèmes de structure par les méthodes physico-chimiques classiques.

Parmi les solutions aqueuses diluées, renfermant à la fois substances protéiques et polyphénoliques que l'on peut utiliser pour de telles études, une place de choix revient à la bière à laquelle PASTEUR avait déjà appliqué son génie novateur. La bière peut être considérée comme une solution-type de stabilité très acceptable pour le physico-chimiste, quoiqu'insuffisante pour l'industriel brasseur. La perte de limpidité prématurée du produit est l'ennemi principal du brasseur. Le problème de

l'instabilité relative de la bière présente donc un double intérêt théorique et pratique et nous avons considéré le phénomène de la formation du trouble spontané dans les bières non plus comme la conséquence des propriétés d'une protéine particulière, ce qui avait été à l'origine de notre première étude, mais sous l'angle beaucoup plus général des propriétés des associations entre une fraction protéique et un composé condensé de nature polyphénolique. Les conclusions de validité générale auxquelles nous sommes arrivés débordent largement du cadre restreint de la brasserie d'où elles sont issues.

Sur le plan théorique, elles apportent une contribution à la connaissance de la nature des liaisons qui peuvent s'établir en milieu très dilué entre polyphénols condensés et matières protéiques, ainsi que sur le mécanisme de formation des associations qui en résultent.

Sur le plan pratique, elles peuvent s'appliquer aux nombreuses solutions d'origine végétale qui contiennent, à la fois, des protéines et des tannins, ce qui est le cas des boissons fermentées, vin, bière et cidre, pour ne citer que les plus importantes.

Cette étude réalisée au cours des années 1957-1961 dans les laboratoires de recherches de l'Ecole de Brasserie de Nancy comprend trois parties principales.

Après une revue bibliographique des phénomènes relatifs à la formation et à la composition des troubles des bières, nous présentons, dans une première partie, l'essentiel des résultats fondamentaux, à savoir la nature des liaisons qui unissent les molécules protéiques P aux composés polyphénoliques ou tannoides T et la mise en évidence de l'existence d'équilibres $P + T \rightleftharpoons P \cdot T$. Cette formulation correspond beaucoup plus à un équilibre d'adsorption qu'à un équilibre réversible au sens thermodynamique du mot.

La seconde partie est consacrée à l'étude du rôle des protéines et des tannoides dans la formation des troubles d'oxydation, ce qui conduit à une explication de la genèse des troubles, en excellente concordance avec les nombreux faits expérimentaux connus.

Enfin, la troisième partie est réservée à la description de la technique expérimentale de diffusion de la lumière dont nous nous sommes servis tout au long de ce travail.

II. — EXPOSE GENERAL BIBLIOGRAPHIQUE

A) Les faits - Définitions.

Par suite du vieillissement et comme résultat de processus complexes que nous nous proposons d'élucider, une bière fraîchement préparée et soigneusement filtrée perd tôt ou tard sa limpidité initiale. On dit qu'elle se *voile* ou qu'elle *trouble* quand elle commence à diffuser la lumière de façon sensible dans les conditions courantes d'observation visuelle.

On appelle trouble, la phase dispersée qui diffuse la lumière. On peut classer les troubles des bières d'après la nature de l'agent physique ou chimique auquel on attribue le rôle principal comme facteur de formation : on parle de trouble au froid réversible ou de troubles irréversibles d'oxydation, métalliques, de protéines, au tannin.

Dans les premiers stades du vieillissement, le trouble apparaît par refroidissement à 0° et disparaît par réchauffement à 20° et au-dessus : on dit qu'il s'agit de trouble au froid ou encore de « trouble réversible ». Au fur et à mesure du vieillissement, la quantité de trouble augmente et une proportion sans cesse croissante de celui-ci devient « irréversible » au sens précédent, c'est-à-dire ne disparaît plus par réchauffement.

De façon générale, un trouble comporte toujours des fractions réversibles et irréversibles en proportions variables. Les solutions de protéines de l'orge (albumines et globulines) présentent un comportement analogue, même après nombre d'essais de purification.

B) Composition du trouble réversible.

La bière est une solution aqueuse, légèrement alcoolisée et saturée de gaz carbonique, renfermant des colloïdes complexes : dextrines, protéines, substances polyphénoliques et acides amers du houblon. Une infime fraction du contenu colloïdal seulement participe au trouble ; aussi la quantité que l'on peut recueillir par centrifugation est extrêmement faible (quelques parties par million). Le trouble séparé, puis lyophilisé, se présente sous forme d'une poudre brune.

La détermination des poids moléculaires par ultracentrifugation avec toutes les restrictions que l'on peut faire au sujet d'un produit hétérogène, soluble en milieu alcalin seulement, lui assigne une valeur moyenne de 20 000 - 30 000 (2) ou 40 000 (3), suivant les auteurs.

Les techniques d'hydrolyse et de dégradation ont permis d'établir que les troubles sont formés de deux constituants principaux : des protéines et des polyphénols accompagnés régulièrement d'hydrates de carbone et de métaux (4).

Le pourcentage des protéines varie suivant les échantillons de 40 à 76 % (4, 5, 6, 7, 8).

Les substances polyphénoliques constituent 35 à 40 % environ du trouble suivant MENDLIK (5), 20 à 50 % suivant HARRIS (9).

Les hydrates de carbone ne représentent que 3 % du trouble selon HARRIS (8), 4 à 6 % selon LJUNGAHL (10) et WALDSCHMIDT-LEITZ en dose de 7 à 13 %.

Enfin, les métaux lourds, cuivre, fer, n'existent qu'à l'état de traces (11, 12, 13).

De nombreux chercheurs ont poursuivi l'analyse qualitative et quantitative de ces différents constituants avec l'espoir d'établir la nature des précurseurs du trouble. Ils pensaient que la connaissance de ces derniers leur permettrait d'atteindre le mécanisme de formation. Aussi peut-on classer les recherches sur le trouble en deux groupes, suivant qu'elles visent plus spécialement l'un ou l'autre des deux constituants principaux.

1) ETUDE DU FACTEUR PROTÉIQUE :

Les recherches tendent à établir une filiation entre la partie azotée du trouble et une des protéines natives de l'orge, ou ses produits de dégradation. Dans ce but, la répartition qualitative et quantitative des acides aminés constituants est comparée à celle des fractions protéiques de l'orge (albumine, globuline, hordéine).

De façon générale, il existe une grande similitude dans la composition des troubles étudiés. L'acide glutamique est le constituant le plus abondant, viennent ensuite : la glycine et l'arginine. Mais alors qu'HARTONG (14), puis SANDEGREN (10), trouvent le constituant protéique du trouble homogène et pensent qu'il a pour origine l'hordéine de l'orge, LUNDIN (15) ne les suit pas dans leurs conclusions et considère la β globuline comme le principal responsable. L'opinion de LUNDIN est appuyée par HELM (16) qui voit une corrélation valable entre la teneur en soufre du trouble et l'abondance relative des groupes sulfhydryles dans la β globuline. SANDEGREN (17) pense aussi que la protéine responsable serait la β globuline dont le poids moléculaire tomberait de 100 000 à 30 000 par protéolyse au cours du brassage. Il constate même, en portant le pH

de la bière à 4,9, point isoélectrique de la globuline, une amélioration de stabilité liée à la floculation préalable de cette protéine (18).

BISERTE et SCRIBAN (19) adoptent une position intermédiaire. Ils voient dans la répartition des acides aminés du trouble, un ensemble qui totalise la composition de deux protéines natives, l'une alcool soluble : l'hordéine, l'autre sel soluble : la β globuline.

Différente est l'idée de GRABAR (20). Il démontre, par sa méthode originale d'immunoélectrophorèse, que les troubles renferment un constituant protéique principal antigéniquement identique à une protéine commune à l'orge, au malt et au moût. Mais ce constituant protéique ne fait pas partie du répertoire des protéines isolées par les méthodes classiques. Une absence de corrélation comparable se dégage aussi des travaux de LONTIE et VOETS (21).

Enfin, DJURTOFT (22) a trouvé que la répartition des acides aminés du trouble ressemble davantage à la composition moyenne de l'ensemble des protéines de l'orge dont est issue la bière, qu'à une fraction protéique déterminée.

Cette étonnante diversité d'opinions est la conséquence de la complexité du problème. Il en résulte que l'on ne peut attribuer le rôle de responsable protéique du trouble à l'albumine, à la β globuline ou à l'hordéine, mais bien plutôt à un ensemble de composés azotés plus ou moins dégradés de l'orge. Ces derniers seraient plus vraisemblablement des polypeptides que des macromolécules de protéines natives, si l'on tient compte du bas poids moléculaire moyen des troubles.

Enfin, les substances azotées du trouble ne représentant qu'une infime fraction du contenu protéique d'une bière, on est amené à penser que la fraction polyphénolique est responsable de l'aptitude au trouble au moins autant que la fraction protéique.

2) ETUDE DU FACTEUR POLYPHÉNOLIQUE :

Dans l'hydrolysate acide ou alcalin des troubles, HARRIS et RICKETTS (9) ont identifié de nombreux dérivés polyphénoliques qui proviennent de substances plus ou moins condensées douées de propriétés tannantes. Parmi celles-ci, une place particulière est faite aux anthocyanogènes, capables, par ébullition en milieu acide fort, de donner naissance aux colorants anthocyanes (cyanidine et delphinidine), dont MAC FARLANE, le premier, a signalé la formation par hydrolyse chlorhydrique de la bière (23). De plus, l'étude spectrographique et chromatographique (24, 25) des hydrolysats de troubles permet de distinguer clairement les polyphénols du malt de ceux qui proviennent du houblon. Ce point de vue est confirmé par HARTONG (14).

Par ailleurs, suivant HARTONG, ces substances polyphénoliques sont déterminantes dans la formation du trouble puisqu'une bière préparée à partir de malt privé de balles et sans houblon, donc appauvrie en tanins, présente une très grande stabilité. CURTIS et HARRIS (26, 27, 28) confirment le même point de vue en constatant que des bières dont on a éliminé une partie des anthocyanogènes par un adsorbant sélectif tel que la poudre de nylon 6 · 6, sont aussi douées d'une stabilité plus grande que celle du témoin non traité.

Le rôle bien établi des substances polyphénoliques dans la genèse des troubles est un fait important pour la résolution du problème de la stabilité des bières. La multiplicité des composés polyphénoliques en cause conduit à penser que le trouble est lié aux propriétés d'une classe de substances : les polyphénols en général plutôt qu'à un représentant particulier. Il reste à découvrir la nature des interactions protéines/polyphénols et le mécanisme de formation des troubles.

C) Mécanisme de formation des troubles.

La conservation d'une bière à une température relativement élevée (30 - 40° C) augmente son aptitude à donner un trouble par refroidissement et cependant l'élévation de température est un facteur de retard dans la séparation d'une phase dispersée.

L'apparition du trouble peut alors être considérée comme la résultante de deux phénomènes antagonistes, ayant des coefficients de température de signes opposés.

- Le premier, accéléré par le chauffage, s'apparente aux réactions chimiques.
- Le second, freiné par le chauffage, peut être comparé à l'action purement physique de la température sur la solubilité de la plupart des substances.
- Le résultat global est rarement prévisible.

Examinons en détail ce double aspect physique et chimique.

1) ASPECT CHIMIQUE :

Les thèses avancées sont très diverses. Elles ne se rejoignent que dans l'affirmation très vague que l'on est en présence de condensations où les phénomènes colloïdaux jouent un rôle important.

Peu de chercheurs pensent comme BISERTE et SCRIBAN (29) à une dénaturation des albumines *sans* intervention de la température et de l'oxydation. De façon générale, deux tendances forment la base des interprétations :

- Les macromolécules responsables du trouble résultent d'associations micellaires protéines - protéines (P - P).
- Les macromolécules responsables résultent d'associations protéines - polyphénols (P - T).

a) *L'idée d'associations P - P* (6) et d'associations protéine (hordeïne) - acide nucléique (30) a été approfondie dans le sens d'une recherche du mode de liaison des protéines :

La présence de ponts disulfure est généralement admise (5, 10, 13).

De plus, BRENNER a mis au point récemment une méthode polarographique qui lui a permis de déceler et de doser dans les bières les groupements sulfhydrylés qui proviendrait de la β globuline de l'orge (31). Il a pu vérifier que les groupes — SH diminuent au cours du temps. Il semblerait donc que, lors du vieillissement de la bière, on soit en présence d'une augmentation du poids moléculaire des protéines provoquée par une oxydation de leurs groupes sulfhydryles avec création de ponts disulfures (32), oxydation vraisemblablement catalysée par des traces de métaux lourds, tels que le cuivre et le fer (33, 34).

Cependant, si séduisante qu'elle paraisse, cette interprétation ne peut expliquer l'abondance généralisée de dérivés polyphénoliques dans tous les troubles et le fait que l'appauvrissement préalable en éléments polyphénoliques entraîne systématiquement un accroissement considérable de la stabilité. Aussi, nous considérons ce phénomène comme vraisemblable, mais secondaire.

b) Par contre, l'hypothèse de l'apparition de combinaisons P · T, proposée par MENDLIK (5), concorde bien davantage avec les faits précédemment énoncés. Par ailleurs, les récents travaux de HARRIS et RICKETTS (25, 26, 27, 28), relatifs à l'adsorption des polyphénols sur nylon, vérifient sans conteste ce point de vue. Enfin, HAUROWITZ (35) suggère que des liaisons hydrogène pourraient se former entre molécules de protéines et de polyphénols.

Quelle que soit l'hypothèse retenue, l'apparition progressive d'une phase dispersée, lors du vieillissement d'une bière, nous oblige à admettre une évolution dans le temps, soit de la fraction P, soit de la fraction T, soit des deux à la fois. Mis à part le cas secondaire de l'oxydation des groupements — SH en — S — S — de la fraction P, cette évolution est

encore fort peu connue. On sait seulement que la stabilité d'un extrait végétal quel qu'il soit et de la bière en particulier est considérablement diminuée par aération (36) et améliorée en présence de réducteurs tels que l'acide ascorbique ou SO_2 (37, 38). Donc, la participation de l'oxygène à la formation du trouble ne fait aucun doute. Cependant, le mécanisme de son intervention n'est établi qu'en ce qui concerne les premières étapes. Selon CHAPON (39), le rôle de l'oxygène est double : d'une part, il ramène en permanence les catalyseurs (ions simples des métaux Cu et Fe et leurs complexes) de la forme réduite à la forme oxydée et, d'autre part, il intervient directement dans l'oxydation couplée de nombreuses substances organiques. De plus, l'eau oxygénée, dont l'accumulation est mise en évidence dans certaines conditions expérimentales est aussi à suspecter puisque l'acide nordihydroguaiarétique — inhibiteur peroxydique — retarde l'apparition du trouble (40), alors que l'addition d' H_2O_2 la favorise. Ainsi, l'oxygène peut conduire à des oxydations de type peroxydasique pour lesquelles la nature des catalyseurs peut avoir une influence prépondérante sur l'orientation des réactions couplées (41). Ces dernières, encore peu étudiées, s'accompagnent généralement d'une augmentation importante de la couleur, ce qui suggère la participation essentielle des substances polyphénoliques. MARSHALL (42) a d'ailleurs établi que la quantité de trouble d'oxydation est approximativement proportionnelle aux quantités d'oxygène et de polyphénols.

L'oxydation des protéines, polypeptides et polyphénols est donc indiscutable, mais elle ne peut expliquer, à elle seule, l'apparition d'une phase dispersée, c'est-à-dire le phénomène physique.

2) ETUDE DU PHÉNOMÈNE PHYSIQUE (aspect physique) :

— Les forces d'attractions électrostatiques ont été invoquées (43) comme cause de trouble : ST-JOHNSTON trouve, en effet, qu'une fraction protéique O, peu sensible aux variations thermiques, pourrait résulter de l'oxydation d'une fraction C dont le point isoélectrique 3,9 est voisin de celui de la bière et que cette fraction chargée négativement pourrait précipiter certains colloïdes chargés positivement dans les bières.

— Une autre explication du phénomène physique consiste à considérer la formation du trouble comme le résultat de l'accroissement régulier de concentration d'une substance relativement peu soluble. Tant que la saturation n'est pas atteinte, il ne se passe rien. Mais, dès que la bière est saturée, la substance en question doit nécessairement se séparer sous forme d'une phase distincte. Cependant, HARTONG (4) souligne qu'une telle interprétation du phénomène n'est pas valable en avançant le fait bien connu que l'addition d'une bière brillante à la

même bière voilée ne provoque jamais la disparition du voile dans le mélange. Le phénomène n'est donc pas aussi simple et l'idée que le trouble réversible se développe par déshydratation de micelles colloïdales est plus probable. Celle-ci, suggérée par DEBAISIEUX (13) est modifiée par HARTONG (4) qui considère le trouble comme un coacervat. Quant à la transformation progressive du trouble réversible en trouble irréversible, HARTONG l'explique en faisant appel à la physico-chimie des interfaces.

L'abaissement de température entraîne, nous l'avons vu, la séparation d'une phase. Les interfaces apparus jouissent de propriétés physiques voisines de celles de la surface libre. Ce sont notamment les lieux d'adsorption préférentielle pour les substances tensio-actives dont la bière est bien pourvue. La concentration locale accrue des substances tensioactives est très favorable à l'établissement de véritables liaisons intermoléculaires qui remplacent partiellement les forces d'adsorption initiales. En raison de leur intensité, elles sont capables de maintenir la cohésion des associations primitives et de s'opposer aux effets d'une agitation thermique importante. La structure du trouble initial se complique avec, comme corollaire, une diminution progressive de la solubilité.

Cette interprétation, bien qu'irréprochable du point de vue physique, présente une lacune. En effet, elle est dénuée de toute considération d'ordre chimique, justifiant la déshydratation.

Elle n'est donc pas liée à un contexte d'ensemble du problème de la formation des troubles et l'étude bibliographique nous révèle qu'il en est ainsi pratiquement pour tous les travaux. Il apparaît impossible de réaliser une synthèse de ceux-ci pour l'explication de la genèse des troubles. Néanmoins, nous pouvons en retenir deux éléments sûrs :

- 1) Les troubles sont des associations de dérivés protéiques et polyphénoliques.
- 2) Ils apparaissent par diminution d'hydrophilie des macromolécules.

En ce qui concerne la nature des liaisons qui maintiennent la cohésion des agrégats et le mécanisme physico-chimique qui conditionne leur séparation sous forme d'une phase dispersée, aucun pas en avant n'a été franchi.

Notre travail consiste donc essentiellement à rechercher le mécanisme de formation des troubles.

PREMIERE PARTIE

EXPOSE DES RESULTATS FONDAMENTAUX ET DISCUSSION GENERALE

Nous nous proposons de répondre aux deux questions essentielles posées dans l'introduction :

1°) Quelle est la nature des liaisons intervenant dans les associations protéines - tanins ($P \cdot T$) qui, malgré leur très faible importance quantitative, apportent des perturbations considérables dans l'étude des protéines végétales par les méthodes optiques, et que l'on s'accorde généralement à reconnaître comme les constituants principaux des troubles des bières.

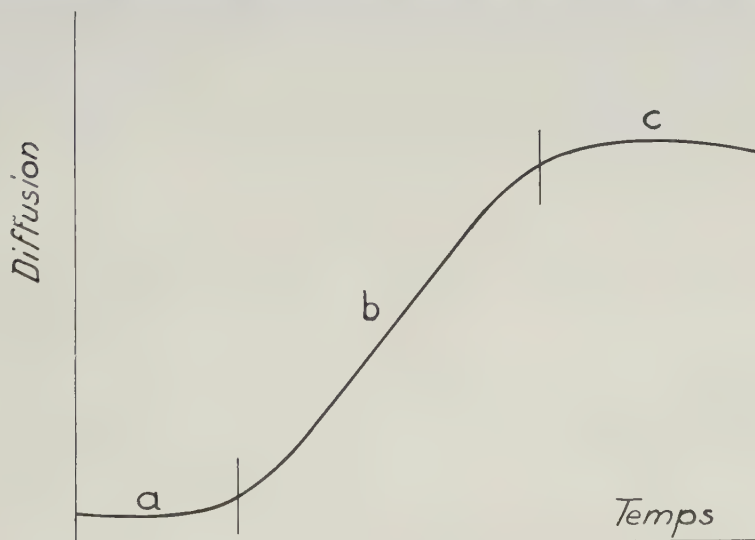


FIG. 1

Evolution en fonction du temps de la turbidité d'une bière.

2°) Quelles lois régissent la formation de ces associations.

L'évolution naturelle d'une bière au cours du vieillissement à température constante, est représentée par la *figure 1* qui schématise le développement de la turbidité repérée par l'augmentation de la diffusion de la lumière en fonction du temps.

On rencontre des courbes de même allure avec des sols purifiés d'albumine ou de globuline d'orge.

Mais l'étude de la cinétique de formation de tels troubles naturels se heurte à de grandes difficultés au laboratoire, car le phénomène est très lent et l'obtention d'une courbe complète demande plusieurs mois.

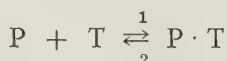
Il est heureusement possible de provoquer la formation de troubles artificiels en ajoutant à la bière un réactif approprié. L'étude donnera des renseignements d'autant plus facilement transposables aux cas réels que les propriétés des troubles artificiels se rapprocheront davantage de celles du trouble naturel. Nous n'avons retenu que les réactifs agissant à concentration très basse et qui ne perturbent ni le pH, ni la force ionique μ , ni la concentration des solutions. On peut les classer en :

- oxydants : dichlorophénol-indophénol, eau oxygénée + peroxydase ;
- précipitants des protéines : tanins (gallique, catéchique, ...), ions des métaux lourds ;
- précipitants des tanins : polyvinylpyrrolidones (P.V.P.), protéines peu solubles.

Parmi ceux-ci, ont retenu plus spécialement notre attention :

- la P.V.P. qui donne des indications extrêmement précieuses sur la nature des liaisons qui peuvent s'établir entre P et T,
- et l' H_2O_2 (en présence de peroxydase) qui conduit, dans un délai très bref, à des troubles dont les propriétés sont très voisines de celles des troubles spontanés. En outre, la mise en évidence des substrats oxydables constitue un progrès important dans la connaissance des précurseurs.

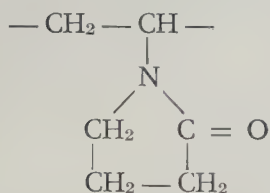
Cependant, bien qu'il existe des différences plus ou moins importantes entre les propriétés des troubles artificiels et naturels, il faut souligner, dès maintenant, que *tous*, au moment où ils apparaissent, peuvent être considérés comme des associations entre constituants protéiques P et tannoïdes T, soumises à des équilibres que l'on peut formuler ainsi :



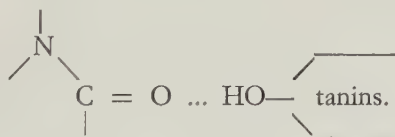
Cette représentation doit être considérée comme l'expression d'un équilibre d'adsorption et non comme un véritable équilibre réversible au sens thermodynamique. Les forces d'adsorption résultent essentiellement de l'existence de liaisons hydrogène entre les deux constituants, mais des liaisons d'un autre type peuvent aussi apparaître par vieillissement et oxydation. Passons maintenant à l'exposé des résultats expérimentaux les plus nets.

NATURE DES LIAISONS

La P.V.P. est un haut polymère dont la structure repose sur la répétition du motif :



Le groupement —CO—N= est en équilibre avec une forme polaire $\text{—CO}^- = \text{N}^+ =$. Selon GUSTAVSON et coll. (48), la disposition régulière de tels groupements sur la chaîne polyvinylique confère à la P.V.P. une aptitude élevée à donner des associations par liaisons hydrogène avec des molécules présentant des hydrogènes mobiles. Ne disposant pas elles-mêmes d'H comparables à celui de la liaison —NH—CO— des peptides, ces molécules ont peu tendance à donner des associations entre elles comme le font les polyamides synthétiques dont le nylon 6.6 est le type. Sa solubilité élevée dans l'eau est la conséquence du nombre important de groupements polaires solvatés. La P.V.P. fixe énergiquement les tanins, substances polyphénoliques condensées riches en —OH libres, en raison de la possibilité de formation de nombreuses liaisons hydrogène.



L'utilisation de la P.V.P. comme agent de stabilisation des bières, préconisée en 1955 par Mac FARLANE (47), reposait, en principe, sur l'élimination des tanins par précipitation. En fait, l'application que nous en avons faite ici met en jeu tout un ensemble de propriétés remarquables que nous allons examiner en détail.

On trouve dans le commerce des polymères de P.M. très différents. Nous prendrons ici deux d'entre eux, l'un de P.M. 40 000 (P.V.P. 40), l'autre de P.M. 700 000 (P.V.P. 700).

1. — Utilisés à *concentration relativement forte* (par ex. 100 à 200 mg/litre de bière), ils ont un comportement identique. Non seulement ils ne donnent aucun trouble dans la bière, mais encore ils préviennent la formation des troubles artificiels et, la plupart du temps, provoquent la dissolution partielle, sinon totale, d'un trouble préformé. Par exemple, la *figure 2* montre l'effet de l'addition de P.V.P. sur la formation d'un trouble à l'étain.

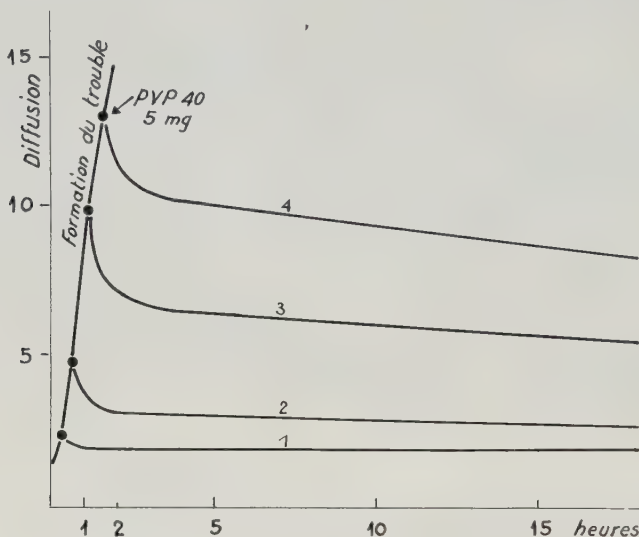


FIG. 2

Les courbes 1, 2, 3, 4 correspondent à quatre essais successifs dans lesquels la P.V.P. 40 000 est ajoutée à 5 cm³ de bière à différents stades de la formation d'un trouble artificiel provoqué par l'addition de 2,5 µg de Sn Cl₂.

La *figure 3* montre l'effet de l'addition de P.V.P. sur la formation d'un trouble d'oxydation peroxydasique. Sur cette dernière figure, on peut noter encore que l'effet dissolvant est beaucoup plus rapide si le trouble est frais que s'il est formé depuis longtemps.

Ces constatations sont également valables pour les troubles naturels des bières, que l'action de la P.V.P. ait lieu sur la bière elle-même ou sur une suspension des troubles isolés par centrifugation et lyophilisés après lavage. Un « trouble au froid » lyophilisé, que l'on peut considérer comme un trouble « réversible » récent s'est dissous à 80 % dans une solution de P.V.P. 40 à 1 %, alors qu'un trouble d'oxydation peroxydasique, trouble oxydé essentiellement « irréversible », ne s'est dissous

qu'à 18 %. Cependant, la solution de trouble au froid dans la P.V.P. est sujette à l'oxydation par l'air, qui y provoque l'apparition d'un voile et une augmentation de couleur.

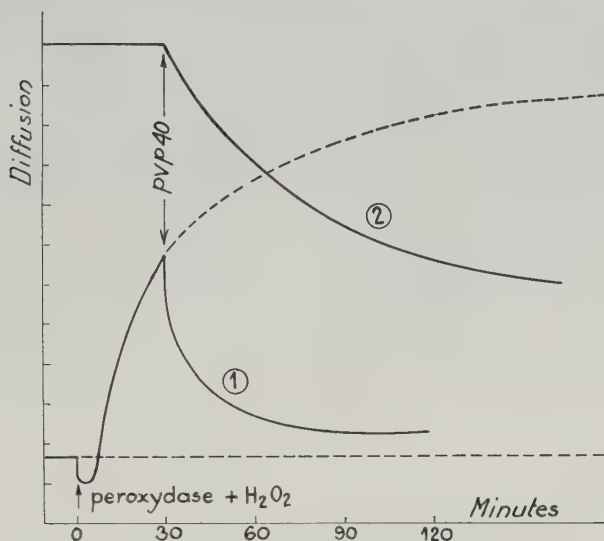


FIG. 3

Effet du vieillissement sur la cohésion d'un trouble d'oxydation peroxydasique.

Dissolution par la P. V. P. 40 000,
1) d'un trouble récent (30 minutes),
2) d'un trouble ancien (14 heures).

2. — Utilisés à *concentration plus faible*, les deux polymères présentent des propriétés fonction du P.M.

Alors que les effets signalés ci-dessus s'atténuent régulièrement quand la concentration en P.V.P. 40 diminue (*figure 4* relative à l'effet de P.V.P. 40 sur les troubles à l'étain et d'oxydation peroxydasique), les essais à la P.V.P. 700 montrent bien d'abord la diminution attendue. mais elle est suivie de l'apparition d'un précipité. La formation de ce dernier est beaucoup plus nette quand on injecte à vitesse constante et faible une solution très diluée de P.V.P. 700 à de la bière, sous agitation constante. Il se forme un voile dès le début de l'addition de P.V.P. 700. L'intensité de la diffusion due au trouble augmente, passe par un maximum aigu, puis diminue. La courbe est presque symétrique *figure 5*.

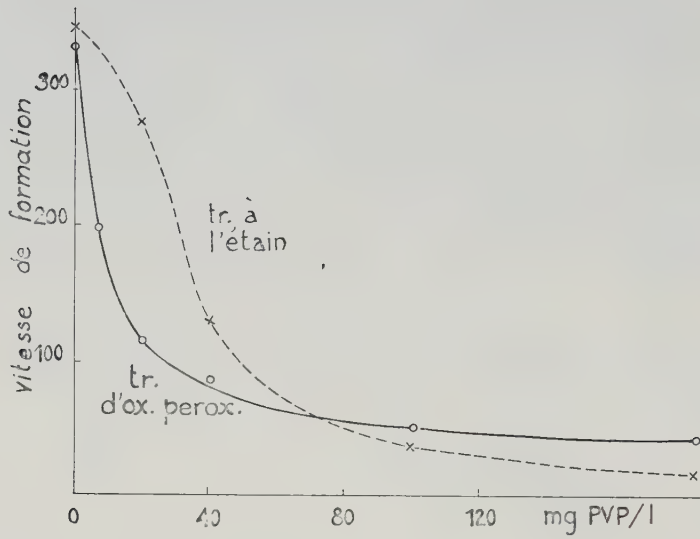


FIG. 4

Effet de concentrations croissantes de P.V.P. sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique et du trouble à l'étain.

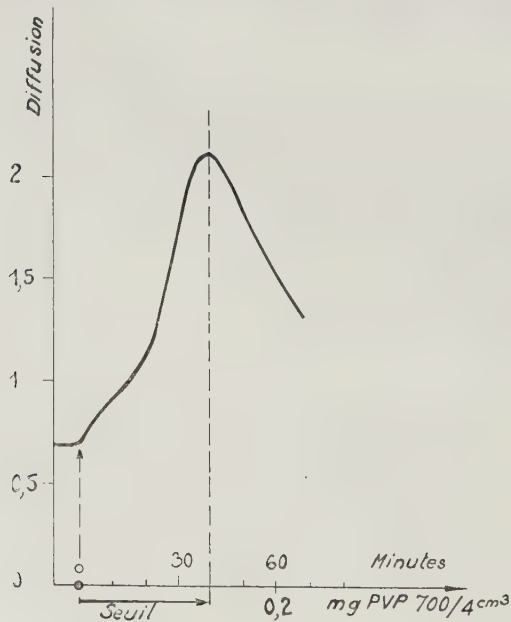


FIG. 5

Formation et disparition d'un précipité par injection de P.V.P. 700 000 dans 4 cm³ de bière.

La vitesse avec laquelle se forme l'association insoluble P.V.P. tannoïdes est élevée. La position du maximum est définie avec précision dans un domaine assez large de conditions expérimentales pour qu'on puisse envisager d'utiliser le phénomène pour un « dosage » des tannoïdes, d'après la méthode proposée dans la partie expérimentale (page 84).

L'allure de la courbe ainsi obtenue s'explique aisément : dans la partie ascendante, la P.V.P. est précipitée au fur et à mesure de son addition par les tannoïdes *en excès*. Dans la partie descendante, le trouble formé se redissout très facilement dans un excès de P.V.P. Le sommet de la courbe est obtenu pour la quantité de P.V.P. qui assure la précipitation la plus complète des tannoïdes présents. Il y a lieu d'insister sur le fait que :

- 1° la position du maximum est indépendante dans une assez large mesure de la vitesse d'injection de la P.V.P., pourvu que celle-ci reste faible ;
- 2° elle est peu affectée par des variations de pH ; seule l'intensité du trouble maximum est diminuée si l'on augmente le pH (figure 6) ;

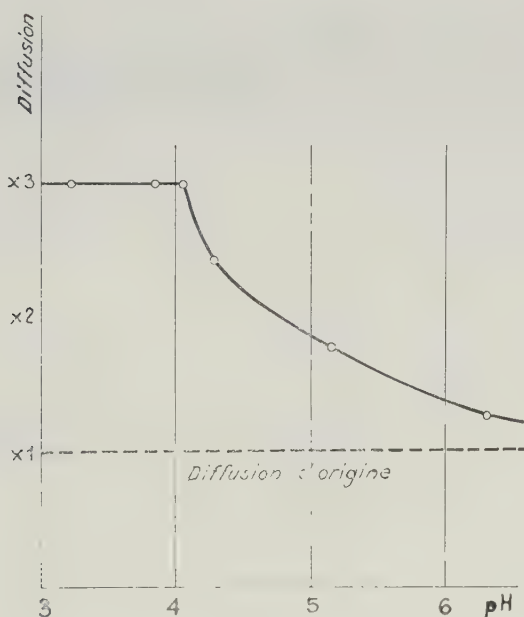


FIG. 6

Variation de l'intensité du trouble à la P.V.P. 700, mesurée au seuil, en fonction du pH.

3° elle est pratiquement indépendante de la température (seule la quantité de trouble l'est). Un chauffage suffisant provoque la dissolution de l'association, alors qu'un refroidissement spontané de la solution claire précédente entraîne la réapparition de l'association insoluble à l'état dispersé (*figure 7*).

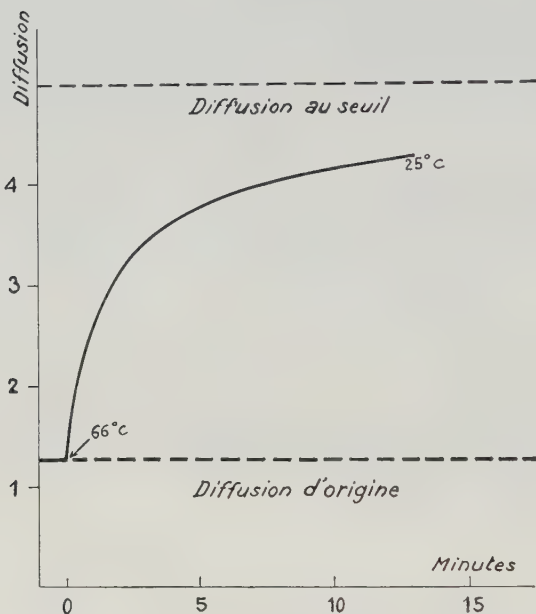


FIG. 7

Réapparition du trouble P.V.P. 700 · T par refroidissement spontané à partir de 65°.

Il suffit d'un très léger excès de P.V.P. pour entraîner la dissolution de l'association préformée. Ce fait est clairement illustré par la *symétrie* presque parfaite de la courbe en cloche.

De telles courbes peuvent être obtenues non seulement avec les tannoïdes des bières, mais avec le tanin gallique et aussi avec des composés polyphénoliques relativement simples dont on peut donner comme exemple la quercétine. Des « dosages », effectués sur des dilutions progressives des solutions de tannoïdes, montrent une relation presque linéaire entre la quantité de P.V.P. nécessaire à l'obtention du maximum (que nous avons appelé « *seuil* » pour simplifier l'exposé) et la quantité de tannoïdes (*figure 8*), de même qu'il existe une relation presque linéaire entre cette dernière et la quantité de trouble (courbe en pointillé *figure 8 bis*).

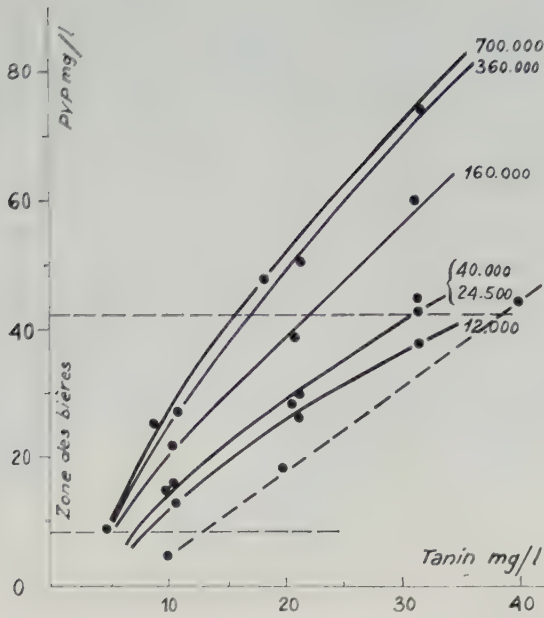


FIG. 8

Seuil du Tanin gallique pour des P.V.P. de P.M. différents.
En pointillés : courbe quercétine - P.V.P. 700.

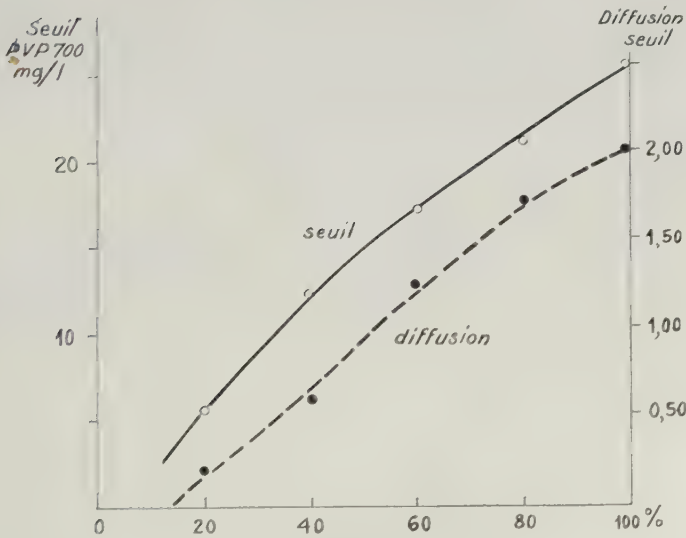


FIG. 8 bis

Effet de la dilution sur le seuil et sur la diffusion au seuil.

Cependant, l'association n'est pas rigoureusement insoluble et en conséquence les très faibles concentrations échappent au dosage. Si, partant de l'hypothèse que le maximum de diffusion est obtenu pour la quantité minima de P.V.P. assurant la saturation des tanins, on calcule, pour le tanin gallique et la quercétine par exemple, le pourcentage de liaisons —OH engagées dans des liaisons H avec le carbonyle de la P.V.P., on arrive aux conclusions qu'il reste environ 50 % des carbonyles de la P.V.P. participant à l'association insoluble non engagés avec le tanin gallique, alors qu'il en reste 20 % seulement dans l'association P.V.P. quercétine.

On peut rapprocher l'action dissolvante que la P.V.P. exerce sur les troubles de celle de l'urée, connue pour rompre les liaisons H intermoléculaires dans des associations telles que des protéines globulaires (49). L'urée effectivement arrête la formation des troubles artificiels, entraîne une rétrogradation plus ou moins prononcée du trouble formé, cependant elle n'exerce une action comparable à celle de la P.V.P. qu'à concentrations très fortes. Des essais mettant à profit l'effet de rapprochement du seuil à la P.V.P. 700 qu'exercent sur une bière, d'une part, la P.V.P. 40, d'autre part, l'urée, ont montré que, dans ce cas, l'urée est environ 900 fois moins efficace que la P.V.P.

Cette première série de résultats expérimentaux permet déjà de se faire une idée assez nette de la nature des liaisons assurant la cohésion entre les principaux constituants des troubles.

a) *Troubles naissants* : la dissolution rapide et complète des troubles naissants par de très faibles concentrations de P.V.P. 40 ne peut s'expliquer que si les liaisons $\text{P} \cdot \text{T}$ dans les troubles sont de même nature que celles qui s'établissent entre T et P.V.P., c'est-à-dire des liaisons *hydrogène*. L'efficacité de la P.V.P. réside dans la multiplicité des groupements —CO—N= accessibles et dans la régularité de la structure du polymère. L'insensibilité relative de la solubilité de l'association P.V.P. $\cdot$ T aux variations de pH peut être considérée comme la conséquence de l'absence de groupements ionisables sur la molécule de P.V.P.

b) *Troubles préformés* : les difficultés croissantes qu'on rencontre dans la dissolution des troubles préformés, aussi bien par chauffage que par action de la P.V.P., au cours de leur vieillissement et qui se traduisent par la nécessité de températures de plus en plus élevées ou de concentrations en P.V.P. de plus en plus fortes, s'interprètent aisément par une augmentation progressive de taille et de compacité des structures insolubles. La rigidité des édifices découle essentiellement :

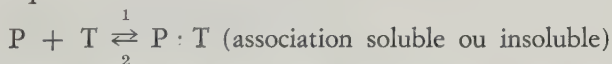
— de la multiplication des liaisons hydrogène, consécutive au rapprochement des groupements appropriés ;

- de l'apparition de liaisons covalentes (surtout si l'oxydation est possible) ;
- de la formation de liaisons métalliques (favorisées par les métaux donnant des hydroxydes colloïdaux, Fe^{+++} et surtout Sn^{++}).

c) *Equilibres Protéines (ou P.V.P.) · Tannoïdes* : la dissolution des troubles naturels ou artificiels naissants par la P.V.P., la désorption des tannoïdes adsorbés sur nylon (ou sur protéines insolubles) par simple chauffage, l'élution par une solution de P.V.P. des tannoïdes adsorbés sur nylon, l'existence d'un maximum très aigü dans la courbe de précipitation des tannoïdes par des quantités croissantes de P.V.P. 700, la rapidité avec laquelle ce trouble particulier atteint une valeur stable pour différentes doses de P.V.P., montrent qu'il existe des équilibres entre phase insoluble et solution.

De plus, la présence d'associations *solubles* P.V.P. · T ou encore P · T peut être aisément démontrée par les essais de dialyse en l'absence et en présence de P.V.P. 40. Ce polymère s'oppose à la dialyse des tannoïdes, de même que son addition à la bière diminue la quantité d'anthocyanogènes adsorbables sur nylon.

Nous sommes amenés à considérer qu'entre T et P (ou P.V.P.), il existe des équilibres de la forme



dépendant de la nature et de la concentration des partenaires P et T. Les résultats exposés montrent que les équilibres s'apparentent aux équilibres d'adsorption et ne doivent pas être considérés comme réversibles au sens thermodynamique du terme.

d) Le caractère *de solubilité* dépend essentiellement du rapport entre le nombre de groupements solvatés de la micelle et la masse micellaire de l'association. On soupçonne alors que l'existence d'un pourcentage plus ou moins grand de groupements polaires libres par unité de volume joue un rôle plus important que la seule masse moléculaire et dépend surtout de la structure relative des participants. S'il est relativement aisé d'avoir une idée de l'importance de ces derniers dans le cas d'associations P.V.P. · Tanin gallique, c'est beaucoup plus difficile dans le cas des associations P · T. La dissolution quasi-générale des troubles des bières par la P.V.P. montre que les tannoïdes ont pour ce polymère une affinité supérieure à celle qu'ils manifestent envers les protéines des bières.

Nous sommes ainsi amenés à chercher quels sont les précurseurs P et T qui donnent naissance le plus facilement à des associations P · T

insolubles, et quelles sont les modifications qui peuvent survenir dans les bières au cours du vieillissement et entraîner la formation des troubles.

On peut considérer que l'apparition d'un trouble résulte d'un déplacement de l'équilibre protéine · tanin dans la bière, par suite de modifications, soit dans la concentration des précurseurs, soit dans leur nature.

Ces transformations diminuent en tout cas l'hydrophilie d'associations primitivement solubles ou en créent de nouvelles insolubles.

Ces considérations mettent en relief la nécessité d'une étude approfondie des deux précurseurs P et T. C'est à ce problème que nous avons consacré la deuxième partie de notre travail.

REMARQUE. — Si l'explication précédente est valable pour la plupart des troubles non biologiques des bières, il faut cependant signaler qu'il existe des troubles qui résistent à la P.V.P. ou qui apparaissent même si la bière a été additionnée de P.V.P. de bas P.M. Nous pensons qu'il s'agit là de troubles micellaires résultant d'une association de certaines protéines. Un exemple nous est fourni par le trouble qui se produit par agitation d'une préparation d'albumine d'orge.

ETUDE DES PRECURSEURS POLYPHENOLIQUES ET DE LEURS TRANSFORMATIONS OXYDATIVES

a) *L'oxydation peroxydasique* est une méthode extrêmement rapide pour créer des troubles dans un milieu naturel renfermant à la fois des composés polyphénoliques et des substances protéiques. Son intérêt vient du fait que les propriétés des troubles dits « d'oxydation peroxydasique » sont très voisines de celles des troubles naturels. Elle a été étudiée par CHAPON à la suite de ses travaux sur la stabilité de l'eau oxygénée dans la bière (39).

Quand on ajoute à la bière de l'eau oxygénée et de la peroxydase en quantités convenables, on observe une augmentation très rapide et considérable de la couleur (*figure 9*).

De plus, il se forme presque toujours un trouble dont on peut suivre le développement en enregistrant l'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps. Pour des oxydations peroxydasiques réalisées dans des conditions identiques, l'accroissement de coloration reste très sensiblement de la même importance pour des bières pâles, mais la quantité

de trouble formé est plus ou moins forte suivant les échantillons. Le phénomène est donc général et, qui plus est, variable en intensité.

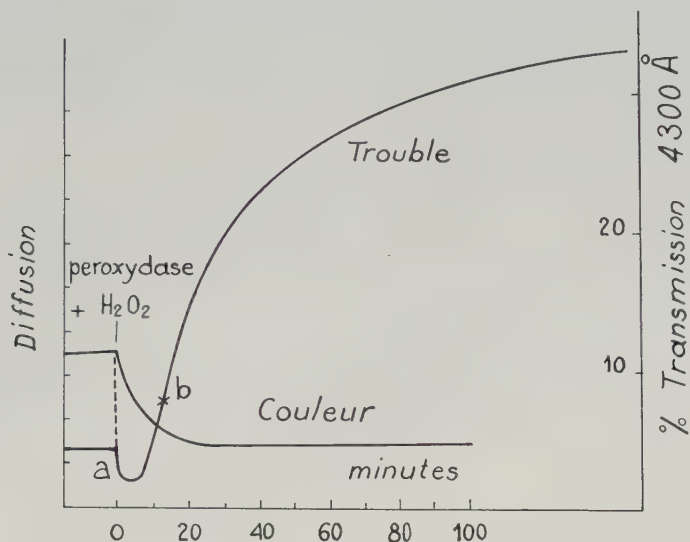


FIG. 9
Oxydation peroxydasique de la bière.

Cette réaction s'est révélée particulièrement bien adaptée à l'étude des troubles d'oxydation. Elle nous a permis d'avancer une explication plausible de leur genèse.

La vitesse de formation du trouble en fonction de la concentration des deux réactifs (H_2O_2 et peroxydase) est illustrée par les figures 10 et 11.

On voit qu'une concentration minimum est indispensable à la formation des troubles. Si l'oxydation est trop lente, en raison d'une quantité insuffisante d'enzyme ou incomplète par suite d'un défaut d' H_2O_2 , la vitesse de formation du trouble et la quantité produite quand la condensation est achevée (trouble « limite ») sont plus faibles. Inversement, si les quantités de réactifs sont en grand excès, on observe de nouveau une chute dans la vitesse de formation du trouble ainsi que dans la quantité de trouble limite.

b) En utilisant les réactifs aux concentrations correspondant aux cercles portés sur les figures 10 et 11, on obtient les courbes dites « d'oxydation peroxydasique standard » que nous avons utilisées tout au long de cette étude.

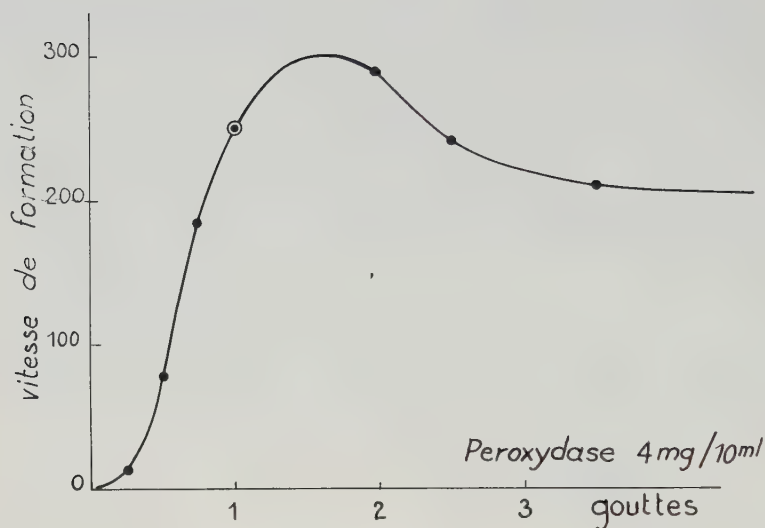


FIG. 10

Effet de la concentration en peroxydase sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique (H_2O_2 = constante).

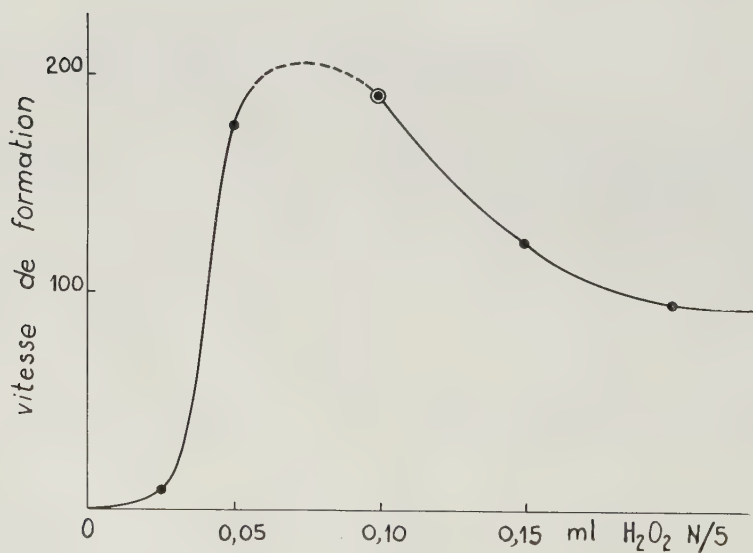


FIG. 11

Effet de la concentration en eau oxygénée sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique (peroxydase = constante).

Dans les premières minutes de la réaction, la lumière diffusée présente un minimum très accusé. C'est la conséquence non d'une dissolution temporaire du trouble comme on serait tenté de le croire, mais de l'assombrissement de la solution entraînant une absorption accrue de lumière. Il est facile de tracer une courbe corrigée tenant compte de l'absorption (*figure 12*).

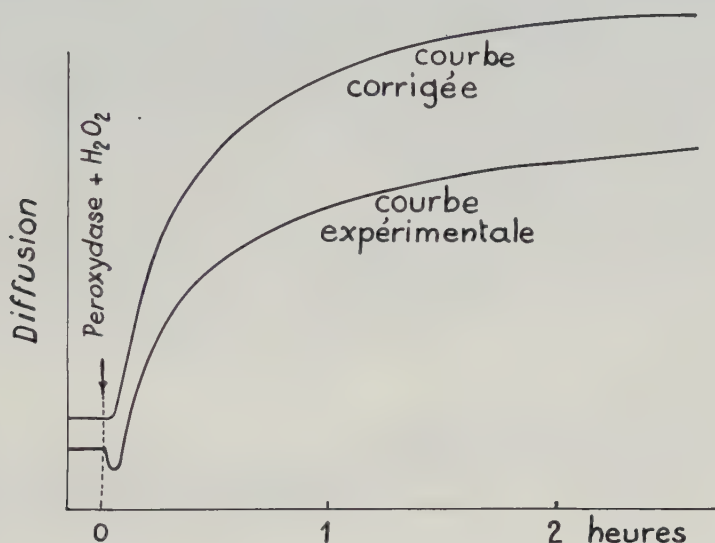


FIG. 12

Courbes de formation du trouble d'oxydation peroxydasique, expérimentale et corrigée.

Elle présente une courte période d'induction, un point d'inflexion après 10 - 20 minutes, enfin un palier plus ou moins rapidement atteint. La vitesse de formation, repérée par la pente au point d'inflexion, varie, en première approximation, dans le même sens que la quantité de trouble limite. Cette remarque justifie la technique d'étude que nous avons adoptée. Pour étudier semi-quantitativement les phénomènes, nous avons pris, comme mesure de l'aptitude à la formation des troubles, la pente sur la courbe corrigée (et même quelquefois directement sur l'enregistrement si les colorations sont du même ordre de grandeur). Nous avons comparé les valeurs obtenues, mesurées en unités arbitraires. Cette technique a le grand avantage d'être rapide, de donner des résultats aisément reproductibles et, bien qu'elle ne soit pas rigoureuse, elle a permis de débroussailler rapidement un domaine extrêmement touffu.

c) La réaction comporte deux stades successifs distincts :

La période d'induction (durée : quelques minutes) correspond à la phase d'oxydation. La coloration du milieu s'assombrit progressivement, mais il ne se produit pas de trouble. On peut arrêter à volonté la réaction d'oxydation en ajoutant au moment choisi, soit de l'acide ascorbique (AH_2), soit du sulfite. Les études fondamentales de CHAPON ont montré qu'il est ainsi possible de détruire instantanément l' H_2O_2 n'ayant pas réagi.

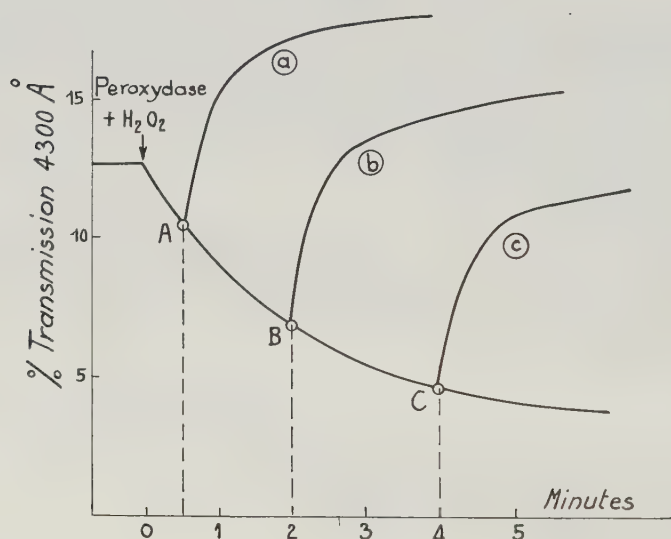


FIG. 13

Effet de l'addition d'acide ascorbique sur la coloration pendant la phase d'oxydation peroxydasique :

- a) addition 30 secondes après le début de l'oxydation ;
- b) addition 2 minutes après le début de l'oxydation ;
- c) addition 4 minutes après le début de l'oxydation.

La figure 13 illustre le résultat de telles additions sur la transmission à 4300 Å et la figure 14 sur la formation du trouble, lorsque l'arrêt de l'oxydation a lieu après des temps croissants.

Il est remarquable de constater que la destruction d' H_2O_2 n'affecte pratiquement pas la formation du trouble si elle a lieu *après* que la condensation (deuxième phase de la réaction) est déclenchée, alors qu'elle l'empêche si elle a lieu *avant*.

Cette expérience très simple souligne l'irréversibilité des processus oxydatifs et s'accorde aussi avec le fait d'expérience que l'addition d'un réducteur (SO_2 , AH_2) est impuissante à dissoudre un trouble préformé même quand ce dernier est encore « réversible ».

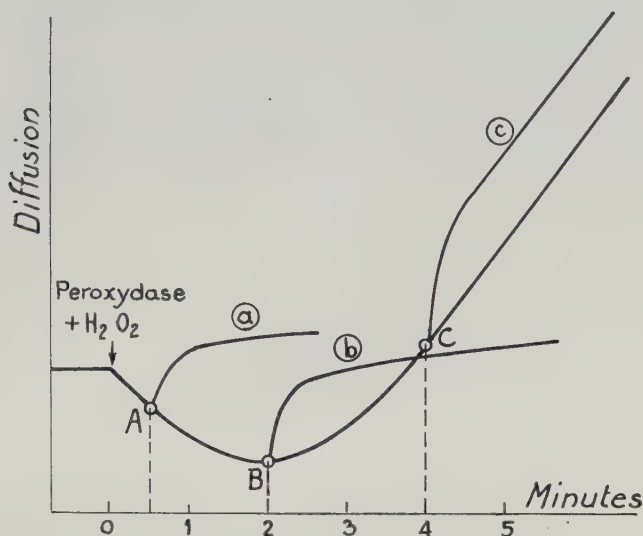


FIG. 14

Effet de l'addition d'acide ascorbique sur le trouble d'oxydation peroxydasique pendant la période d'induction :

- a) addition 30 secondes après le début de l'oxydation ;
- b) addition 2 minutes après le début de l'oxydation ;
- c) addition 4 minutes après le début de l'oxydation.

d) La vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique est à peu près proportionnelle à la *concentration* des précurseurs. Ainsi, des dilutions successives de la bière de départ donnent des vitesses représentées par la *figure 15*.

La courbe ne passe toutefois pas par l'origine, ce qui peut s'expliquer par une certaine solubilité du trouble.

e) *pH* et μ . On retrouve dans l'influence que ces deux facteurs exercent sur l'intensité du trouble d'oxydation peroxydasique, des résultats qualitativement identiques à ceux qu'on peut obtenir sur des troubles naturels :

— si l'on fait varier le pH d'une bière présentant *déjà* un trouble naturel ou artificiel, de plus ou moins une unité autour de la valeur

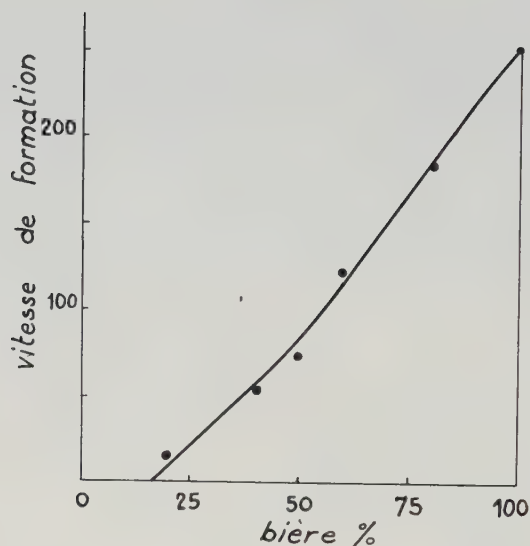


FIG. 15

Variation de la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique en fonction de la dilution de la bière.

normale, on ne constate aucun changement important dans son intensité (figure 16, courbe 1).

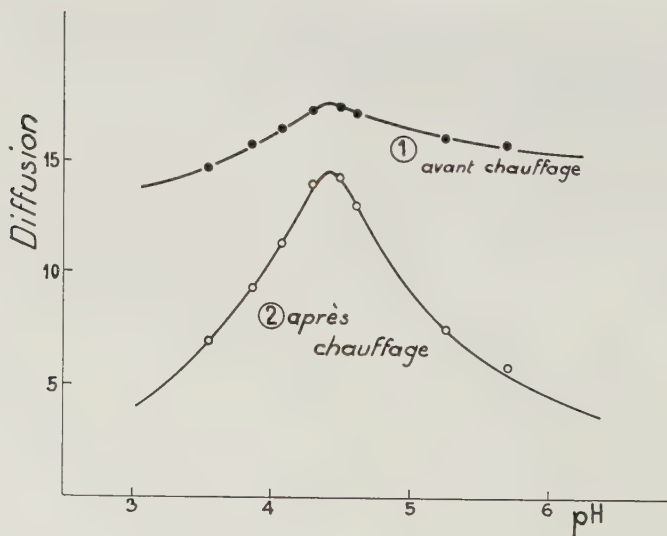


FIG. 16

Variation de l'intensité d'un trouble d'oxydation peroxydasique préformé, en fonction du pH, avant et après chauffage.

Il y a généralement un maximum peu accusé au voisinage du pH initial des bières. Si on augmente μ (ClNa), on constate une légère baisse de l'intensité du trouble (*figure 17, courbe 1*).

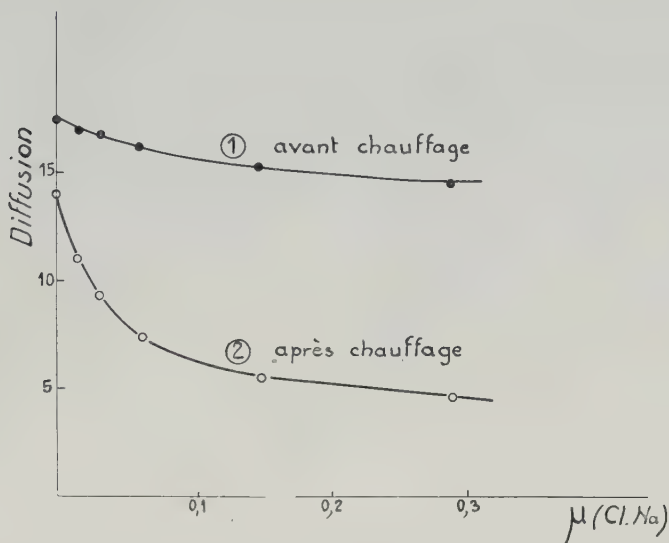


FIG. 17

Variation de l'intensité d'un trouble d'oxydation peroxydasique préformé, en fonction de μ , avant et après chauffage.

— si on reprend les expériences précédentes en les associant à une élévation de température suffisante pour dissoudre partiellement les troubles formés, puis qu'on examine leur intensité après refroidissement, on constate alors une variation relative nettement plus importante : *figures 16 et 17, courbes 2*.

Si on modifie le pH ou μ avant de faire agir le système oxydant et qu'on mesure soit l'intensité du trouble quand il a atteint son maximum, soit ce qui est plus rapide, sa vitesse de formation, on constate (*figures 18 et 19, courbe a*) que les variations de pH et de μ ont beaucoup plus d'effet que ne le laissent prévoir les courbes des figures précédentes.

La solubilité en fonction du pH présente un minimum aigü qui correspond à la zone de pH isoélectrique de l'association P · T. Si le pH et la force ionique sont ajustés juste avant la condensation (au point C de la figure 14), les phénomènes sont d'autant moins nets que la phase de condensation est plus avancée (*figures 18 et 19, courbe C*).

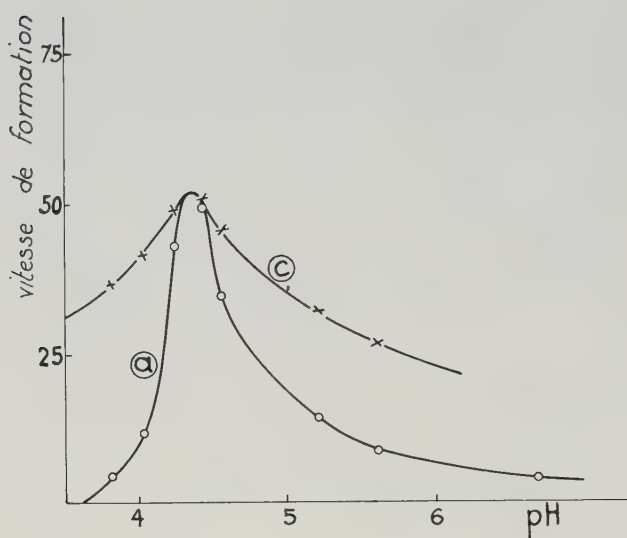


FIG. 18

Vitesse de formation d'un trouble d'oxydation peroxydasique en fonction du pH :

- a) le pH est ajusté avant le début de l'oxydation ;
- c) le pH est ajusté 4 minutes après le début de l'oxydation.

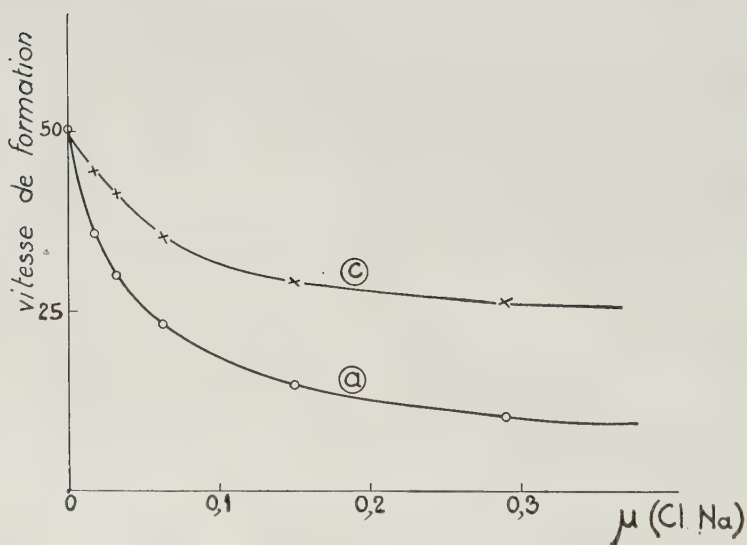


FIG. 19

Vitesse de formation d'un trouble d'oxydation peroxydasique en fonction de μ :

- a) μ est ajusté avant le début de l'oxydation ;
- c) μ est ajusté 4 minutes après le début de l'oxydation.

— enfin, on peut encore provoquer l'oxydation à un pH pour lequel il n'y a pas formation de trouble, et seulement après, quand tout l'oxydant a disparu, modifier le pH. On obtient encore, dans ce cas, une courbe présentant un maximum aigü pour la même valeur de pH que précédemment.

Les autres troubles artificiels (tanin gallique, D.C.I., Sn^{++}) ont tous un comportement voisin de ce qui vient d'être dit, mais l'analogie est particulièrement frappante dans le cas du trouble d'oxydation peroxydasique et c'est cette similitude qui nous a poussés à l'étudier de plus près.

L'action relativement faible des variations de pH et μ sur les troubles préformés peut être comparée à l'irréversibilité de tels troubles à la température ou à la P.V.P. Une fois formé, le trouble est beaucoup moins réactif. Sa dissolution exige la mise en œuvre de moyens énergiques alors que sa prévention est relativement beaucoup plus facile. L'oxydation peroxydasique constitue un outil extrêmement maniable pour aborder et préciser le rôle des protéines et des tannoïdes dans la formation des troubles d'oxydation et par suite pour en élucider le mécanisme.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE N° 1

ETUDE DES TANNOIDES

I. — INTRODUCTION A L'ETUDE DES PROTEINES ET DES TANNOIDES

Nous avons démontré qu'il existe dans les bières des équilibres du type $P + T \xrightleftharpoons[2]{1} P \cdot T$ apparentés aux équilibres d'adsorption, les associations $P \cdot T$ pouvant être solubles ou insolubles. Nous avons attribué la formation d'un trouble à l'apparition d'associations insolubles $P \cdot T$.

En réalité, on ne doit pas considérer *un seul* équilibre de ce genre, mais des équilibres ou mieux encore *une série* d'équilibres entre les différents constituants P et T présents simultanément dans une bière.

A l'aide de la P.V.P., nous avons montré qu'affinité entre un constituant T et un constituant P n'est pas forcément synonyme d'insolubilité. Il paraît plus normal de caractériser un trouble par son « *produit de solubilité* », bien qu'apparition et disparition du trouble ne puissent être considérés que dans de rares cas comme un phénomène réversible au sens thermodynamique. Peut-être est-ce valable dans le cas de ce qu'on appelle en brasserie trouble « réversible ». Mais le plus souvent, le système est doué d'inertie et la dissolution d'un trouble n'est possible que moyennant un apport d'énergie complémentaire, que cette dernière soit fournie sous forme de chaleur ou qu'elle découle de l'intervention d'un réactif doué d'affinité élevée pour l'un des constituants (affinité très

élevée de la P.V.P. pour les tannoïdes). Quoi qu'il en soit, cette notion est commode et nous avons insisté sur le fait qu'à l'origine les troubles sont réversibles, ce qui justifie l'utilisation de cette notion.

Nous allons montrer :

1°) que vis-à-vis d'une protéine pure ou même vis-à-vis d'une solution protéique complexe, il existe des tannoïdes T capables de donner naissance à des associations dont les solubilités s'échelonnent dans de larges limites.

2°) qu'avec un même tannoïde T les différentes protéines P peuvent aussi donner des associations de solubilités variées.

Nous montrerons également que, quelle que soit leur nature, les associations $P \cdot T$ possèdent un ensemble de propriétés communes avec les troubles naturels. En particulier, leur solubilité présente, en fonction du pH, un minimum en milieu acide, très souvent dans le domaine de pH des bières 4,0 - 4,5.

L'apparition d'un trouble peut alors provenir :

- soit du déplacement d'un équilibre particulier par augmentation de la concentration du constituant T ;
- soit de la formation d'un constituant T' susceptible de former une association $P : T'$ de solubilité inférieure à $P : T$;
- soit de l'évolution d'un constituant P donnant naissance à un constituant P' tel que l'association $P' \cdot T$ ait une solubilité inférieure à $P \cdot T$.

Nous n'avons pas abordé dans notre travail le dernier aspect du problème.

II. — DEGRE DE CONDENSATION DES TANNOIDES ET SOLUBILITE DES ASSOCIATIONS

1) Tanins conduisant à la formation d'associations peu solubles.

Le tanin gallique en est le type. C'est un produit de condensation polydispersé de molécules de penta-m - digalloyl-glucose. Son poids moléculaire est vraisemblablement très élevé puisque le tanin gallique est en grande partie retenu par ultrafiltration sur des membranes Lsg 60, de porosité correspondant au passage de substances de poids moléculaire inférieur à 15 000.

Le tanin gallique dont la propriété d'association par liaisons hydrogène avec les protéines et la P.V.P. a déjà été signalée, possède une affinité élevée pour les protéines : même à des doses extrêmement faibles, ses solutions fraîches entraînent la formation d'un louche dans la bière, donc l'apparition d'associations insolubles $P \cdot \text{Tanin}$. Le trouble demande un certain temps pour atteindre son maximum.

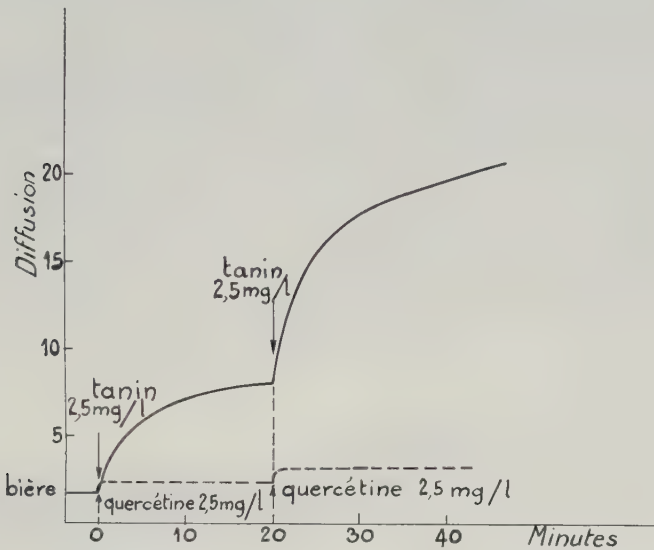


FIG. 20

Formation de troubles par additions de 2,5 mg/l ;
— de tanin gallique (trait plein) ;
— de quercétine (pointillés).

La courbe de la *figure 20* est un exemple de l'évolution de l'intensité de diffusion d'une bière à laquelle on a ajouté, par deux fois, successivement 2,5 mg de tanin par litre. Cette inertie de formation du trouble est vraisemblablement liée au caractère macromoléculaire de P et du Tanin (accessibilité difficile de certains groupements $-\text{OH}$ et $=\text{CO}$).

On peut également injecter dans la bière, à vitesse constante et sous agitation permanente, une solution très diluée de tanin. Afin de tenir compte de l'inertie de formation du trouble, il est nécessaire d'opérer à vitesse très lente : 0,15 mg de tanin par heure pour un volume de bière de 5 cm^3 . Dans ces conditions, nous obtenons l'enregistrement représenté *figure 21*.

Cette courbe montre que le tanin provoque la précipitation progressive d'une quantité croissante de protéines, ou plutôt d'une association P · T, car le précipité est fortement coloré. La pente de cette courbe présente un intérêt certain. Une même quantité de tanin produit un trouble d'autant plus abondant que la bière renferme plus de substances protéiques facilement précipitables. S'il était aisé de standardiser une solution de tanin, on aurait là un moyen simple d'atteindre la « sensibilité protéique » de la bière.

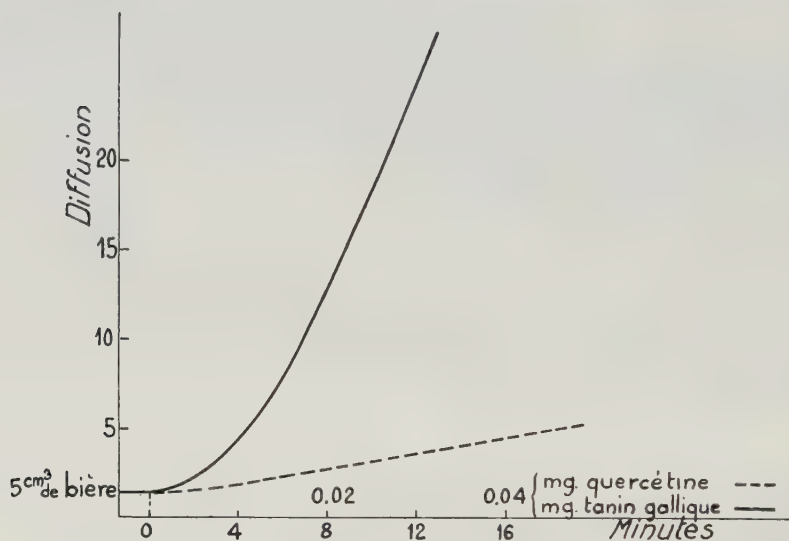


FIG. 21

Formation de troubles par injection à vitesse très lente (0,15 mg par heure) ;
 — de tanin gallique (trait plein) ;
 — de quercétine (pointillés).

Si l'addition de tanin se poursuit, on se trouve rapidement devant un floculat trop abondant pour continuer l'enregistrement néphélométrique. En reprenant l'expérience précédente sur la même bière diluée dix fois, on obtient l'enregistrement de la *figure 22* (dans les mêmes conditions de vitesse d'injection et de concentration en tanin).

On voit que, mis à part deux périodes : en-deçà de (a) et au-delà de (b), le trouble croît proportionnellement à la quantité de tanin mise en œuvre. En-deçà de (a), les associations P · Tanin, pauvres en tanin, possèdent encore une certaine solubilité. Au-delà de (b), on peut considérer que le déplacement de l'équilibre dans le sens (1) tend à devenir total par suite de la précipitation progressive des constituants protéiques.

Par addition d'une quantité limitée de tanin, un nouvel état d'équilibre s'établit dans la solution.

On pourrait penser a priori que le tanin en tant que substance polyphénolique hautement condensée, à potentiel de liaison hydrogène très élevé, précipite simplement les protéines et s'élimine entièrement dans le précipité.

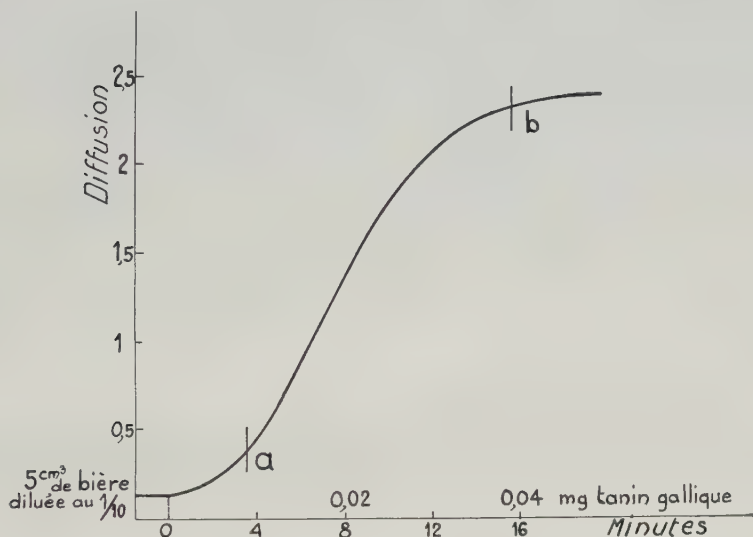


FIG. 22

Formation de trouble au Tanin par injection à vitesse très lente (0,15 mg par heure) à la bière diluée au 1/10.

En réalité, il n'en est rien et une partie du tanin ajouté reste en solution dans un nouvel état d'équilibre qui peut être facilement démontré de deux façons :

1) après centrifugation du précipité, la concentration en tannoïdes du surnageant est plus élevée que celle de la bière d'origine : en effet, les surnageants limpides de plusieurs échantillons d'une même bière traitée par des doses progressivement croissantes de tanin, se troublent réciproquement quand on les mélange ;

2) la concentration en tannoïdes précipitables par la P.V.P. 700 dans les surnageants dont on vient de parler, croît d'autant plus que la quantité de tanin mise en jeu est plus grande (*figure 23*).

(1) est la courbe des seuils de précipitation à la P.V.P. 700, de solutions pures de tanin dans l'eau, de concentrations progressivement croissantes.

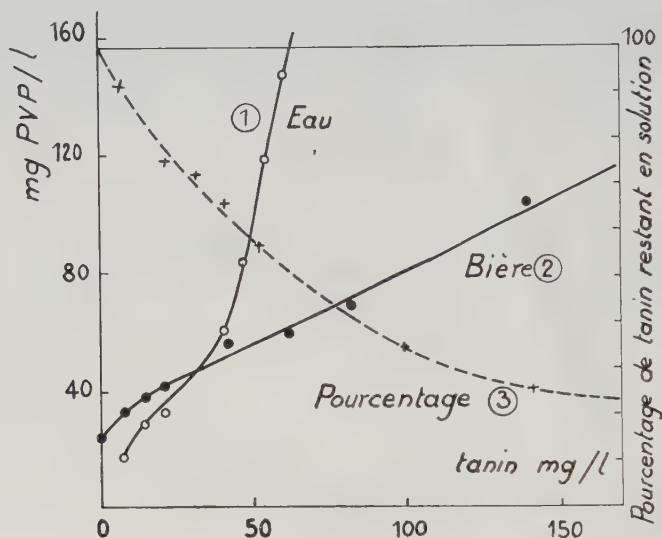


FIG. 23

Variation du seuil de solutions de tanin gallique :

- 1) dans l'eau ;
- 2) dans la bière (après centrifugation du précipité) ;
- 3) courbe des pourcentages de tanin gallique restant en solution.

(2) est la courbe des seuils de précipitation à la P.V.P. 700 des surnageants d'une bière traitée par des doses croissantes de tanin (indiquées en abscisses), puis centrifugée. On voit immédiatement que la quantité de tanin restant en solution augmente avec la concentration en tanin ajouté. Il s'établit donc dans la solution claire un nouvel équilibre.

La courbe (3) exprime la proportion de tanin ajouté qui reste dans le surnageant. On la déduit des courbes (2) et (1). Il est clair que le tanin, au fur et à mesure de son addition, précipite des fractions protéiques de plus en plus solubles.

2) Substances polyphénoliques simples conduisant à la formation d'associations de solubilité moyenne.

De nombreux polyphénols trouvés dans les produits d'hydrolyse des troubles naturels, s'offrent à l'expérimentation. L'étude comparative abordée au chapitre suivant, conduit à choisir comme exemple la quercétine dont le poids moléculaire 302 est beaucoup plus faible que celui du tanin condensé.

Si nous réalisons avec la quercétine les mêmes essais qu'avec le tanin gallique, nous constatons des différences marquées de comportement. Ajoutée à la bière en même concentration que le tanin (*figure 20* en pointillé), la quercétine provoque l'apparition d'un trouble extrêmement ténu. De plus, la formation de ce trouble est ici pratiquement instantanée, ce qui peut s'expliquer en considérant le faible encombrement de la molécule de quercétine et, par suite, l'accessibilité facile de ses groupements —OH.

Lorsque la solution de quercétine est injectée de façon continue, la courbe en pointillé de la *figure 21* témoigne de la formation d'associations insolubles, en quantité beaucoup moins abondante que si le facteur T est le tanin gallique. Ce caractère l'apparente aux tannoïdes des bières limpides. On est donc amené à penser que les associations $P \cdot \text{Quercétine}$ doivent leur solubilité relative au nombre réduit de liaisons H qui unissent la protéine et la quercétine et par analogie que les associations solubles $P \cdot T$ des bières ne font intervenir simultanément qu'un nombre limité de liaisons hydrogène. Pour réaliser la saturation des —CO—NH— de la protéine, il est nécessaire d'avoir recours à une concentration relativement élevée en un tel constituant T. Cette concentration est évidemment aussi fonction de la nature de la protéine.

Quercétine et tanin gallique constituent donc, en quelque sorte, des extrêmes dans l'échelle des pouvoirs tannants des polyphénols plus ou moins condensés, dont il serait fort intéressant de connaître les intermédiaires. Nous avons obtenu ces derniers à partir de précurseurs polyphénoliques simples, par la méthode de l'oxydation peroxydasique.

3) Tannoïdes des bières.

Nous avons appelé « Tannoïdes précipitables » les substances polyphénoliques condensées qui donnent avec la P.V.P. 700, pour laquelle ils ont une très grande affinité, une association insoluble au pH de la bière. Ils ne sont définis que par cette propriété et il n'y a pas d'identité entre ces tannoïdes et les « anthocyanogènes » de HARRIS, pas plus

qu'il n'y en a entre eux et les « tanins » précipitant par la cinchonine dont ils ne constituent qu'une faible partie (environ le dixième) (57). Anthocyanogènes et tannoïdes précipitables ne se recouvrent que partiellement.

Pour expliquer la formation des troubles, ces corps sont spécialement intéressants puisqu'ils sont caractérisés par leur pouvoir tannant vis-à-vis d'une substance de nature comparable à une protéine : la P.V.P.

On peut avoir une idée précise de leur concentration par la méthode de dosage précédemment décrite. Les valeurs s'échelonnent dans les bières courantes entre 10 mg et 60 mg/litre exprimées en P.V.P.

Cependant, il convient de remarquer encore une fois que le terme « Tannoïdes précipitables » groupe une catégorie de substances dont toutes les propriétés ne sont pas nécessairement identiques d'une bière à l'autre. L'expérience montre que, malgré leurs différences possibles de composition, ces tannoïdes peuvent s'adsorber avec facilité sur une polyamide insoluble telle que la poudre de nylon, une protéine insoluble animale ou végétale ou encore une levure. En solution dans la P.V.P. 40 à pH 4,2, ils présentent dans l'U.V. un spectre d'absorption d'allure caractéristique (fig. 24, courbe a) très semblable à celui d'une solution de trouble au froid dans la P.V.P. 40 (courbe b).

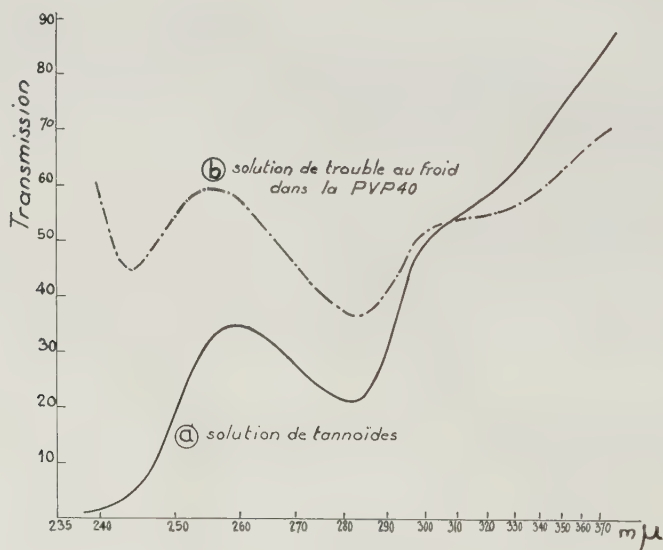


FIG. 24

Spectres d'absorption U.V. :

- a) d'une solution de tannoïdes dans la P.V.P. 40 à 1 % ;
- b) d'une solution de trouble au froid dans la P.V.P. 40 à 1 %.

Leur propriété de s'adsorber sur la poudre de nylon ou de précipiter par addition d'une quantité convenable de P.V.P. de poids moléculaire élevé peut être mise à profit pour les éliminer de la bière (techniques de HARRIS et de MAC FARLANE).

4) Produits d'oxydation des tannoïdes.

a) Pour comprendre la genèse des troubles naturels d'oxydation, il est spécialement intéressant de souligner que ces tannoïdes précipitables sont les précurseurs oxydables responsables principaux de la formation des troubles d'oxydation peroxydasique. En effet, bien qu'il ne puisse exister en raison de la remarque précédente une corrélation absolue entre la teneur en tannoïdes précipitables et la vitesse d'oxydation peroxydasique dans le cas de bières quelconques, elle existe pour une même bière que l'on dépouille progressivement de ses tannoïdes précipitables par un traitement à la poudre de nylon, ou que l'on soumet à une oxydation ménagée.

Par un excès de poudre de nylon, il est possible de débarrasser totalement une bière des précurseurs tannoïdes du trouble. Toutefois, elle contient encore des dérivés polyphénoliques non tannoïdes qui brunissent par oxydation peroxydasique.

De même, si l'oxydation peroxydasique a été conduite avec un excès de réactifs, on constate, qu'après élimination du trouble par centrifugation, la bière ne contient plus de tannoïdes précipitables par la P.V.P. et qu'elle est insensible à toute nouvelle tentative d'oxydation peroxydasique. Les tannoïdes oxydés se sont unis aux protéines et ont été éliminés dans le trouble. Mais on peut aussi montrer que l'oxydation poussée de certains tannoïdes leur fait perdre leur propriété de s'associer à la P.V.P. C'est ainsi que l'oxydation peroxydasique d'une suspension (P.V.P. 700). (Tanin gallique) provoque la disparition du trouble ; ce fait montre que les phlobaphènes insolubles résultant de l'oxydation des tanins sont dépourvus de propriétés tannantes.

Ainsi donc, il existe *un stade d'oxydation optimum pour la formation du trouble* correspondant à un produit de condensation doué de propriétés tannantes maximales. Si l'oxydation est trop brutale (excès d'eau oxygénée et de peroxydase) (voir courbes fig. 10 et 11), on obtient moins de trouble que si elle est plus lente.

L'oxydation des tannoïdes précipitables en solution dans la P.V.P. 40 à 1 % entraîne une modification du spectre U · V, ainsi que le montre la *figure 25*.

L'absorption augmente et les particularités du spectre disparaissent progressivement, ce qui témoigne d'une complication de structure. L'oxydation se produit spontanément, mais lentement par abandon de la solution au contact de l'air, elle est rapide par utilisation d'eau oxygénée et de peroxydase.

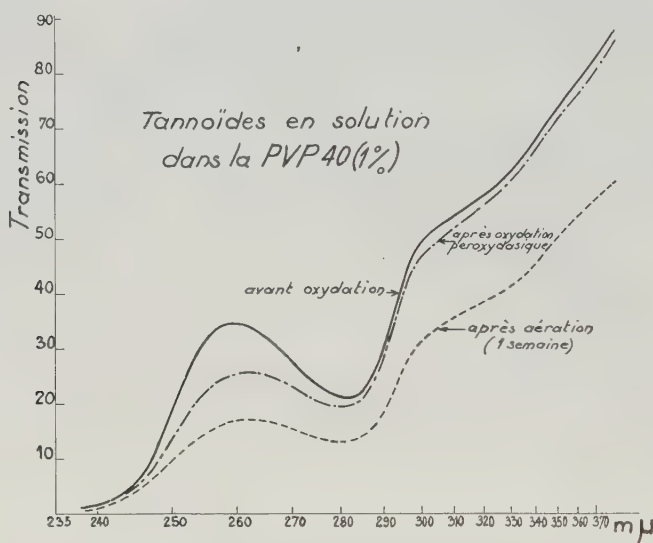


FIG. 25

Spectre d'absorption U.V de tannoïdes en solution dans la P.V.P. 40 à 1 % avant oxydation peroxydasique, après oxydation et après aération.

b) Mais l'oxydation *ménagée* des bières se manifeste aussi par un autre phénomène de la plus grande importance pour l'explication de la formation des troubles spontanés d'oxydation.

Quel que soit le réactif utilisé (O_2 de l'air sans ou avec catalyseur, D.C.I., H_2O_2 + peroxydase, ...), on observe, dans la majorité des cas, une augmentation de la concentration en tannoïdes précipitables. Cet accroissement peut atteindre 100 %. Il ne s'explique que par la formation de tannoïdes précipitables aux dépens de précurseurs non tannoïdes.

Parallèlement, la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique augmente.

c) *Quercétine* : un certain nombre de composés polyphénoliques, parmi lesquels de nombreuses substances identifiées par HARRIS dans les

produits d'hydrolyse des troubles, se comportent comme les tannoïdes des bières. Le comportement le plus typique est celui de la quercétine, dont nous avons étudié les propriétés tannoïdes vis-à-vis de la P.V.P.

Il suffit d'ajouter à une bière quelques p.p.m. de quercétine qui, à des concentrations aussi faibles, ne provoque aucun voile pour augmenter de façon significative la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique.

Les bières qui ont été débarrassées de leurs tannoïdes :

- soit par adsorption sur nylon, fibrine, etc...,
- soit par précipitation par la quantité optima de P.V.P. 700,
- soit par oxydation peroxydasique préalable,

peuvent être sensibilisées par addition d'une substance polyphénolique telle que la quercétine. L'effet de concentrations croissantes se traduit sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique comme l'indique la *figure 26*.

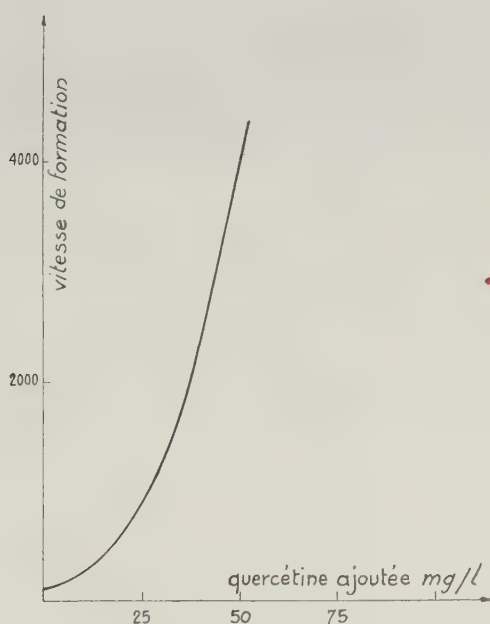


FIG. 26

Augmentation de la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique par addition de quercétine à une bière.

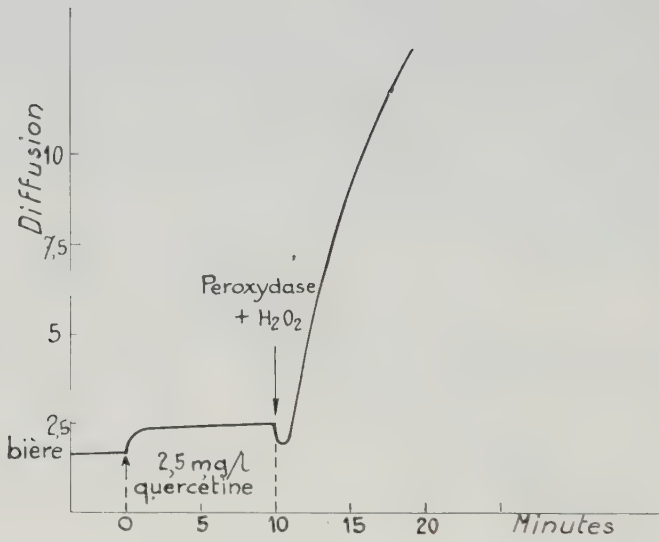


FIG. 27

Formation du trouble d'oxydation peroxydasique après addition préalable de quercétine (2,5 mg/l).

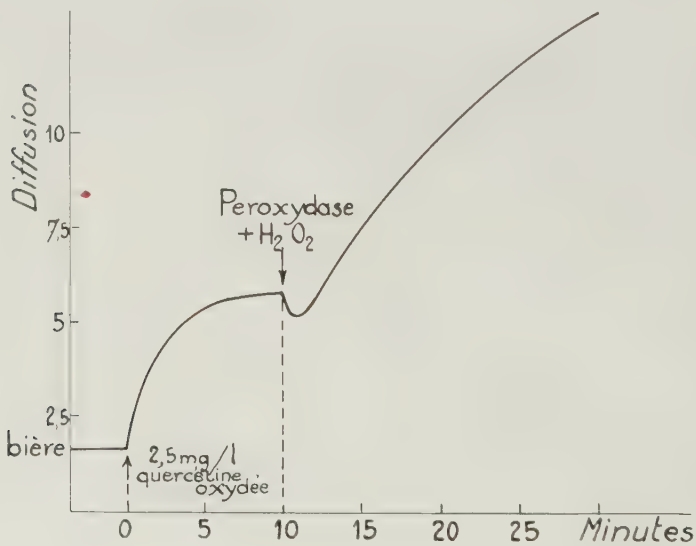


FIG. 28

Formation du trouble d'oxydation peroxydasique après addition préalable de quercétine oxydée (2,5 mg/l).

L'analogie entre tannoïdes des bières et quercétine peut être poussée encore plus loin. L'oxydation de la quercétine par l'air (simple exposition à l'air d'une solution aqueuse légèrement alcoolique ou alcaline de quercétine) donne naissance à des produits condensés qui provoquent immédiatement un voile par mélange à une bière (fig. 28). On obtient un phénomène semblable par une oxydation peroxydasique légère. L'oxydation peroxydasique de cette bière voilée donne naissance à un trouble dont la vitesse de formation (fig. 28) est inférieure à celle du témoin (fig. 27), ce qui est aisément compréhensible, puisque la fraction oxydée de quercétine s'est déjà associée aux protéines de la bière dès l'addition, avant oxydation.

5) Interprétation.

Tous les faits généraux mis en évidence jusqu'à présent nous permettent, dès maintenant, d'avancer avec certitude les idées suivantes :

a) L'insensibilité d'une bière, après la première oxydation peroxydasique, est la conséquence de la disparition de composés polyphénoliques oxydables. Ce sont eux que l'on dose par précipitation à la P.V.P. 700 sous le nom de tannoïdes précipitables et qui participent au trouble au froid.

b) Il existe une grande *identité de comportement à l'oxydation* entre un *polyphénol simple*, tel que la *quercétine* et les *tannoïdes des bières*.

Rappelons que quercétine et tannoïdes des bières forment, avec la P.V.P. 700, des associations insolubles.

De plus, l'oxydation peroxydasique et l'oxydation par l'oxygène de l'air de la quercétine et des tannoïdes donnent naissance à des corps solubles qui déplacent l'équilibre $P \cdot T$ vers la formation d'associations insolubles à la manière du tanin gallique (phénomène non immédiat). De tels phénomènes sont connus pour intervenir dans la formation de purpurogalline, à partir du pyrogallol, de la lignine à partir de corps plus simples dérivés de la structure de l'isoeugénol, de produits d'oxydation colorés dans le thé (44). Ce sont donc les produits de condensation des précurseurs qui constituent les tannoïdes actifs.

Le degré de condensation est déterminé, soit par la concentration en oxydant (H_2O_2), soit par le temps d'aération. On peut obtenir rapidement par oxydation peroxydasique, lentement par aération, tous les intermédiaires entre les composés « très peu tannants » et « très fortement tannants ».

c) Ce qui est énoncé au paragraphe précédent fait simultanément ressortir la *similitude* indéniable entre produits d'*oxydation peroxydasique* et d'*oxydation par aération* des bières. Cette similitude est renforcée par la ressemblance des spectres U.V. des tannoïdes oxydés des deux façons et justifie l'emploi de la méthode d'*oxydation peroxydasique* comme moyen d'*oxydation* rapide.

d) Les accroissements du seuil de précipitation à la P.V.P. 700 et de la vitesse d'*oxydation peroxydasique* consécutifs à l'aération ne peuvent s'expliquer que s'il existe à côté des tannoïdes normalement présents dans la bière, des précurseurs polyphénoliques. Ceux-ci se transforment par oxydation en produits de condensation doués des propriétés des tannoïdes.

III. — NATURE DES TANNOIDES ET SOLUBILITE DES ASSOCIATIONS

Les tannoïdes de la bière sont constitués d'un ensemble de composés polyphénoliques et non d'un corps défini. Les recherches de HARRIS sur le trouble au froid (8) en font foi.

Il est donc intéressant de savoir dans quelle mesure l'enrichissement de la bière en divers polyphénols relativement simples augmente la vitesse de formation du trouble d'*oxydation peroxydasique* ou, en d'autres termes, de comparer les pouvoirs tannants des divers produits de condensation. Parmi les nombreux composés polyphénoliques connus, il semble logique d'examiner de préférence ceux identifiés par HARRIS dans le malt et le houblon, et dans les produits d'hydrolyse du trouble au froid : quercétine, dihydroquercétine, acide nordihydroguaiarétique, phloroglucine, morine, kâmpférol, kâmpféride, catéchine, rhamnétine, quercitrine, rutine, acide caféique, acide férulique, cyanidine, acide chlorogénique.

Avant toute étude, une remarque d'ordre expérimental relative à la mise en solution et à la conservation des produits s'impose.

1°) Préparation des solutions de polyphénols.

a) Nous avons vu au sujet de la quercétine, combien l'aération favorise une rapide oxydation. Il est donc indispensable soit de travailler avec des solutions fraîchement préparées, soit d'utiliser des solutions conservées sous azote.

b) Les polyphénols purs précités ne peuvent être solubilisés directement dans l'eau. Aussi avons-nous utilisé la technique qui consiste à les dissoudre préalablement dans l'alcool éthylique à 90° à raison de 10 mg pour 5 cm³ et de compléter à 10 cm³ d'eau pour obtenir des solutions à 1 ‰.

Par ailleurs, nous avons vérifié que l'addition d'alcool ne modifie en rien la vitesse de condensation par oxydation peroxydasique.

2°) Oxydation peroxydasique des substances polyphénoliques simples :

De façon générale, la plupart des composés polyphénoliques en solution à faible concentration donnent lieu, par oxydation peroxydasique, à la formation de produits de condensation *solubles*, colorés en jaune ou brun.

Font exception, certains dérivés phénoliques ortho-méthoxylés qui conduisent, en outre, à la formation d'un trouble en l'absence de toute protéine. Ce sont : l'eugénol, la vanilline, l'acide vanillique, l'acide férulique, dont la parenté avec la lignine et l'acide « testinique » isolé par STEVENS (51) des balles d'orge a été établie (52). Ils se comportent comme le gaïacol dont l'oxydation peroxydasique conduit au tétragaïacol (45) suivant la réaction.

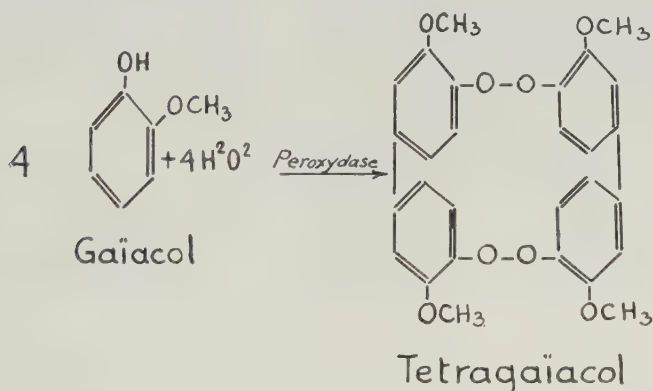


FIG. 29

Oxydation peroxydasique du Gaïacol.

La structure du tétragaïacol (fig. 29) démunie d'—OH phénolique montre que ce composé, fortement coloré en brun, est insoluble par

manque de groupements hydrophiles et ne peut pas être tannant. C'est ce qui explique que la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique du gaïacol, de même que celle des dérivés précités, n'est absolument pas augmentée par la présence de constituants protéiques. C'est pour cette même raison que l'addition même copieuse de P.V.P. 40 ne peut pas rétrograder les troubles d'oxydation de ces dérivés o-méthoxylés. *Seule l'action conjuguée de P.V.P. 40 et d'acide ascorbique peut solubiliser ces troubles.* Il semble qu'on puisse interpréter cette solubilisation comme le résultat d'une réduction partielle par l'acide ascorbique qui ramènerait les dérivés oxydés dans des formes intermédiaires possédant quelques —OH phénoliques susceptibles de s'associer à la P.V.P.

3°) Oxydation peroxydasique des substances polyphénoliques simples, en présence de constituants protéiques :

— les polyphénols, ou dérivés polyphénoliques suivants :

pyrocatéchine, pyrogallol, phloroglucine,
acide gallique, acide digallique,
acide chlorogénique, acide caféique, acide nordihydro-
guaïarétique,

augmentent la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique de la bière, lorsqu'on les y introduit à raison de quelques p. p. m.

Il y a lieu de remarquer ici que LONTIE et VANCRAENENBROECK (53) avaient signalé que l'addition d'acide nordihydroguaïarétique, qui est utilisé par ailleurs comme antioxydant des graisses, augmentait la sensibilité des bières au trouble au froid, ce qui est en contradiction d'ailleurs avec le travail de BEATTIE (40).

Les substances suivantes, apparentées à la famille des anthocyanes, se comportent comme les dérivés précédents :

d-catéchine,	kämpférol,
quercétine,	kämpfériide,
dihydroquercétine,	rhamnétine,
quercitrine,	morine.
rutine,	

Après avoir reconnu leurs effets du point de vue qualitatif, il était spécialement intéressant de rechercher leur efficacité relative. Ce sont naturellement les substances qui, à concentration égale, donnent naissance au trouble le plus abondant qui nous intéressent le plus.

Le tableau suivant donne, par ordre décroissant, l'efficacité de quelques-unes des substances précédentes, exprimée par les vitesses de

formation du trouble d'oxydation peroxydasique. Celles-ci ont été mesurées suivant la méthode décrite, après addition à la bière des composés polyphénoliques en solution alcoolique, à raison de 10 p. p. m. La bière d'origine, identique dans tous les essais, présentait elle-même une vitesse faible :

quercétine	1 385
ac. nordihydroguaïarétique	870
rhamnétine	595
acide caféique	365
morine	260
d-catéchine	145
dihydroquercétine	130
kämpférol	120
kämpféride	120
cyanidine	95
ac. chlorogénique	80
phloroglucine	60
quercitrine	60
rutine	38
bière témoin	38

Sans vouloir attribuer à ces valeurs une précision qu'elles ne peuvent avoir, il est cependant remarquable de constater que, de tous les corps étudiés, c'est la quercétine qui, de loin, donne l'accroissement le plus important de la vitesse de formation du trouble.

L'influence considérable que peuvent avoir sur la réactivité, des modifications relativement faibles dans la molécule, est remarquable.

a) Ainsi, la morine, isomère de la quercétine (—OH en 2' au lieu de 3') a une activité nette, mais très inférieure.

b) La méthylation de l' —OH en 7 (rhamnétine) diminue fortement la vitesse, quoique la rhamnétine soit encore passablement active.

La suppression de l' —OH en 3' (kämpférol) a un très grand effet, alors que la méthylation de l' —OH en 4' du même kämpférol (kämpféride) n'est suivie d'aucun changement d'activité.

La dihydroquercétine, par contre, a une activité très atténuée, ainsi que la d-catéchine.

c) Les résultats les plus frappants sont obtenus avec les produits qui résultent de l'introduction d'oses en position 3. Ainsi, le rhamnoside (quercitrine) a une activité presque nulle et le rutinoside (rutine) est dépourvu d'activité. On comprend alors que l'on ne puisse pas retrouver

ces constituants dans les produits d'hydrolyse du trouble. Connaissant, d'autre part, le pouvoir tannant important de la quercétine oxydée, il est certain que les sucres liés à l'aglycone sont les responsables de l'insensibilité des glucosides. Ils encombrant considérablement les molécules d'aglycone et, de ce fait, freinent et peuvent même bloquer le processus de condensation par oxydation.

On peut alors se demander si l'hydrolyse de ce type de composés, en libérant de la quercétine, ne pourrait pas être cause de l'évolution de la sensibilité des bières avec le temps. Mais nous nous sommes heurtés à une stabilité élevée des combinaisons. Une tentative d'hydrolyse prolongée pendant trois mois à la température ambiante et à pH acide 3,75 est sans effet et il est nécessaire d'opérer à 50° C pour déceler une modification infime pour la rutine, légèrement plus marquée dans le cas de la quercitrine.

Précisons enfin que si deux composés polyphénoliques : l'un très actif, la quercétine, l'autre peu actif, la d-catéchine, sont respectivement ajoutés à une même bière, leur différence d'activité dans l'oxydation peroxydasique est d'autant plus marquée qu'ils sont pris à dose élevée (fig. 30).

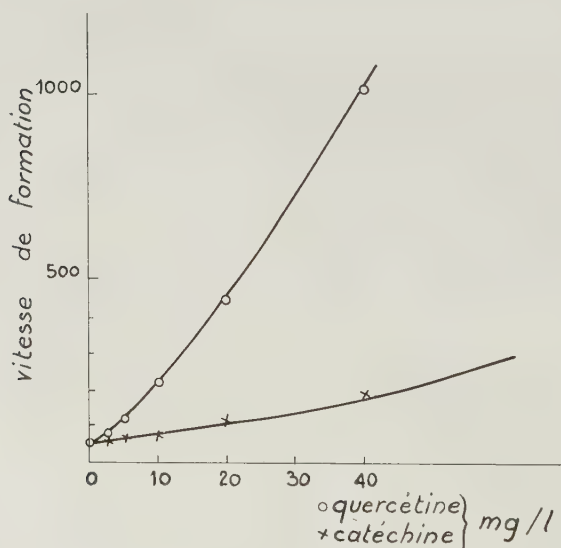


FIG. 30

Effets comparés d'additions de quercétine et de d-catéchine sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique.

IV. — NATURE DES TANNOIDES ET pH OPTIMUM DE FORMATION D'ASSOCIATIONS INSOLUBLES

L'influence de la nature du tannoïde ne se manifeste pas uniquement sur le caractère plus ou moins tannant des produits d'oxydation. Lors de l'étude de la réaction d'oxydation peroxydasique, il a été établi, qu'en fonction du pH, la vitesse de formation du trouble passe par un maximum très aigu. Ce pH optimum d'association varie légèrement d'une bière à l'autre. On peut également le modifier en traitant la bière par un polyphénol quelconque.

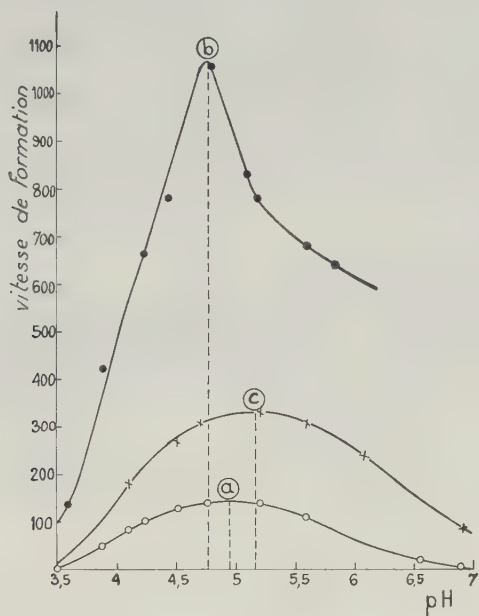


FIG. 31

Effet du pH sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique :

- a) de bière ;
- b) de bière + quercétine (16 mg/l) ;
- c) de bière + catéchine (16 mg/l).

Les courbes d'oxydation peroxydasique de bière en fonction du pH (fig. 31, courbe a), de bière + quercétine (16 mg/l) (courbe b), et de bière + catéchine (16 mg/l) (courbe c) montrent, en effet, que le pH optimum d'association dépend de la nature du polyphénol ajouté.

Le pH optimum en présence de quercétine est systématiquement inférieur au pH optimum en présence de catéchine. De plus, des essais d'oxydation en fonction du pH de substrats tels que β globuline bovine + quercétine et β globuline bovine + catéchine, dans des conditions qui seront précisées ultérieurement, fournissent des résultats semblables (fig. 32).

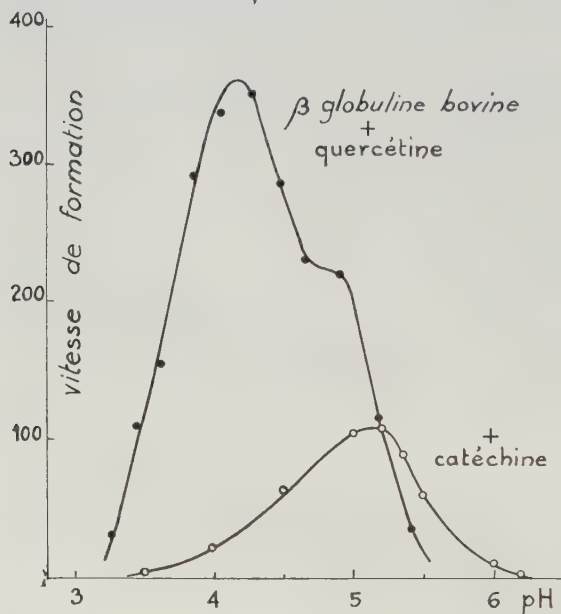


FIG. 32

Le minimum de solubilité des associations Protéines-Tannoïdes condensés est fonction de la nature du polyphénol. Exemple de la β globuline bovine.

Le pH optimum en présence de catéchine est supérieur à celui du substrat en présence de quercétine.

Enfin, l'élimination d'une fraction des tannoïdes de la bière par adsorption sur une substance comme la fibrine, dont nous étudierons les propriétés dans la troisième partie, s'accompagne également d'une diminution du pH optimum (fig. 33).

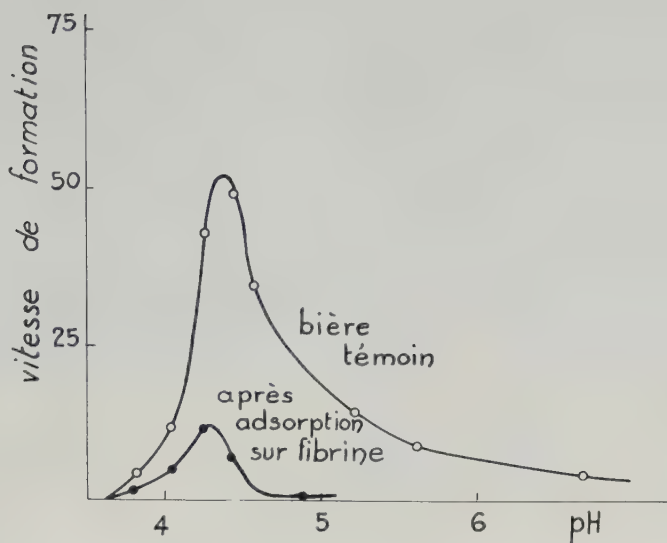


FIG. 33

Effet du pH sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasiqne avant et après adsorption sur fibrine.

Il est donc incontestable que, pour une même solution protéique, la nature du tannoïde conditionne le pH pour lequel l'insolubilité des associations $P \cdot T$ est maximum.

CHAPITRE N° 2

ETUDE DES PROTEINES DU TROUBLE

I. — ROLE DU FACTEUR PROTEIQUE

Nous venons de voir qu'en solution aqueuse très diluée à un pH voisin de 4, les tannoïdes précipitables et de nombreuses substances polyphénoliques ne donnent naissance à aucun trouble par oxydation peroxydasique, tandis qu'en solution dans une bière elles conduisent à un trouble abondant.

La présence d'acides aminés dans les produits d'hydrolyse de ces troubles (voir tableau I) montre l'intervention de substances de nature protéique. Nous nous proposons de préciser la nature des protéines qui participent à leur formation.

En premier lieu, nous établissons :

- d'une part, que l'eau oxygénée ne provoque pas la formation de trouble si, en présence de peroxydase, elle agit sur des solutions diluées de protéines ;
- d'autre part, que les protéines soumises à cet essai d'oxydation n'ont pas, vis-à-vis d'un polyphénol condensé, un comportement différent de celui des témoins non-oxydés.

1°) Protéines des bières.

Considérons d'abord l'ensemble protéique apporté par une bière et choisissons pour cela :

- soit une bière naturellement insensible à l'oxydation peroxydasique ;
- soit une bière que l'on a débarrassée de ses tannoïdes par un traitement au nylon, à la fibrine ou à la poudre de peau.

TABLEAU I (*)

Amino - acides	% d'azote d'après KJELDAHL			
	a	b	c	d
Acide aspartique ..	4,0	4,9	1,2	4,2
Thréonine	2,7	3,1	0,8	2,8
Sérine	4,3	4,3	1,0	3,5
Acide glutamique ..	13,0	13,1	1,9	6,7
Proline	7,2	6,1	1,5	5,3
Glycocolle	7,5	7,5	2,1	7,4
Alanine	3,1	3,5	1,1	3,9
Cystine	3,0	3,3	0,6	2,1
Valine	5,1	2,9	0,8	2,8
Méthionine	0,7	0,1	1,3	4,6
Isoleucine	1,7	2,6	0,5	1,8
Leucine	4,6	5,1	0,8	2,8
Tyrosine	1,9	2,3	0,5	1,8
Phénylalanine	1,8	2,0	0,4	1,4
Histidine	5,2	6,4	1,5	5,3
Lysine	3,5	3,4	1,3	4,6
Arginine	9,6	8,1	2,3	8,1
Ammoniaque	14,8	14,7	7,7	26,3
Azote récupéré	93,7	93,4	27,3	95,4
Azote % du trouble	7,37	7,46	7,39	

- a) Trouble d'oxydation peroxydasique. Rendement : 102 mg/l.
- b) Trouble d'oxydation peroxydasique après addition de quercétine à la bière à raison de 30 mg/l. Rendement : 190 mg/l.
- c) Précipité à la P.V.P. 700 (rendement : 28 mg/l). Acides aminés entraînés par le précipité, exprimés en azote % de l'azote total.
- d) Précipité à la P.V.P. 700. % d'azote recalculé sur les bases d'un pourcentage normal d'azote : 95,4 %.

(*) Analyses effectuées au Heiligenberg Institut, Professeur WALDSCHMIDT-LEITZ, auquel nous exprimons ici nos vifs remerciements.

L'échantillon est divisé en deux parties :

- la première est conservée sous azote sans traitement (témoin) ;
- la seconde est soumise à une oxydation peroxydasique standard (qui provoque une augmentation de couleur, mais pas de formation de trouble), puis débarrassée de l'oxygène et conservée également sous azote. Après 24 heures, elle ne contient plus d'eau oxygénée.

On dispose ainsi :

- d'un substrat protéique de bière témoin ;
- d'un substrat protéique de la même bière oxydée.

On ajoute alors à chacun une même quantité de quercétine et on détermine les vitesses de formation du trouble d'oxydation peroxydasique dans les conditions standards retenues. On ne constate pas de différence sensible entre les deux essais.

On doit donc admettre que l'oxydation peroxydasique préalable des protéines des bières ne modifie pas sensiblement leur aptitude à former un trouble par association avec les polyphénols condensés résultant de l'oxydation peroxydasique de leurs précurseurs.

Avant de passer à l'étude des produits de fractionnement des bières, nous avons examiné le comportement de quelques solutions de protéines particulières dans une oxydation peroxydasique standard.

2°) Protéines pures diverses.

Nous avons soumis aux essais un certain nombre de protéines pures diverses de la firme américaine N. B. C. (Nutritional Biochemical Corporation) :

- | | | |
|---------------------------------|---|---------------------------------|
| — ovalbumine | } | en solution à 1 ‰, |
| — α globuline bovine | | |
| — β globuline bovine | | |
| — β lactoglobuline bovine | | |
| et | | |
| — gluténine | } | en suspension stable, |
| — édestine | | en faible concentration, 0,1 ‰. |

Ces protéines donnent par oxydation peroxydasique, en présence d'un polyphénol comme la quercétine, des troubles dont les caractères sont analogues à ceux des troubles d'oxydation des bières.

Si on les soumet à une oxydation peroxydasique, leurs solutions ne montrent, par contre, aucun changement de coloration, ni de turbidité. Après un repos de 24 heures pour assurer l'élimination de l'eau oxygénée restante, elles se comportent en présence de quercétine, exactement comme les solutions témoins, en ce qui concerne la formation du trouble d'oxydation peroxydasique. En conséquence, nous sommes autorisés à admettre que l'oxydation peroxydasique n'affecte pas les constituants protéiques des bières, pas plus que de nombreuses autres protéines, dans leur capacité d'association avec les polyphénols condensés.

Nous ne pouvons cependant pas exclure la formation possible de ponts —S—S— intermoléculaires par oxydation de groupes —SH ; mais ce processus, s'il existe, ne peut interférer que de façon négligeable avec le mécanisme de formation des troubles d'oxydation. Le rôle des protéines dans la formation d'associations insolubles $P \cdot T$ *par oxydation* est donc essentiellement potentiel et non évolutif. Seuls, les tannoïdes évoluent. On peut alors parler d'un potentiel protéique de trouble d'une bière, celui-ci étant défini par la concentration et la nature des protéines susceptibles de participer à la formation de troubles.

II. — CARACTERES DU POTENTIEL PROTEIQUE

1°) Affinité des protéines pour les tannoïdes.

Les essais de précipitation par le tanin gallique nous ont conduits à tracer la courbe 3 de la figure 23, représentant la quantité de tanin restant en solution dans la bière. Celle-ci est continûment croissante et ne présente aucun palier. On en déduit :

- a) que la formation d'un trouble ne peut correspondre à la précipitation d'un seul constituant protéique défini ;
- b) que le potentiel protéique est constitué d'une série de composés doués d'affinités régulièrement variables pour le tanin.

2°) Concentration des protéines.

Lors de l'étude des tannoïdes, nous avons déjà signalé le fait qu'une bière oxydée n'est plus sujette à formation de trouble, uniquement par déficience tannoïdique, puisque l'addition d'un composé polyphénolique

restaure sa sensibilité élevée à l'oxydation. En même temps, nous montrons que les protéines qui participent à l'équilibre protéines - tanins au cours de l'oxydation sont abondantes.

La concentration en protéines, quoique élevée, est évidemment variable suivant les bières. Il est facile de vérifier que l'accroissement de concentration en tanin entraîne un déplacement de l'équilibre protéines - tannoïdes vers la formation d'associations insolubles : pour cela, il suffit de traiter une bière par des doses croissantes de tanin allant jusqu'à 2 mg par litre, de centrifuger les liqueurs obtenues, puis de mesurer les vitesses d'oxydation peroxydasique des surnageants. La courbe, exprimant ces vitesses en fonction des quantités de tanin ajouté, présente une forme en cloche avec un maximum très pointu extrêmement élevé. (fig. 34, courbe a).

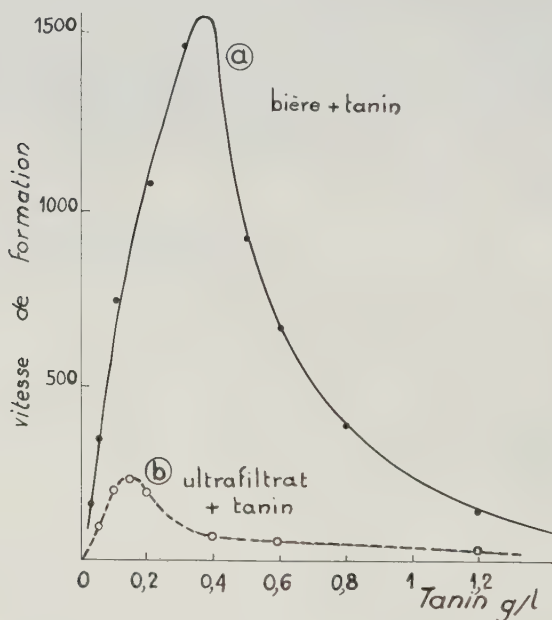


FIG. 34

Effet de l'addition de quantités croissantes de tanin gallique sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique :

- a) d'une bière ;
- b) de son ultrafiltrat.

L'interprétation de cette figure est immédiate. Dans la partie ascendante, il y a excès de protéines. L'accroissement de vitesse correspond

à l'augmentation de la concentration du tanin en solution. C'est cette dernière qui limite le phénomène. Au-delà du maximum, bien que la concentration en tanin croisse toujours, la quantité de protéines susceptibles de s'associer diminue en raison de leur précipitation sans cesse plus importante. C'est donc la concentration en protéines qui limite le phénomène dans la partie descendante de la courbe.

Enfin, lorsque toutes les protéines précipitables par le tanin ont disparu, la vitesse d'oxydation s'annule pratiquement.

3°) Composition de la fraction protéique en acides aminés.

L'abondance du contenu protéique jointe au caractère d'étalement des affinités pour les tannoïdes militent en faveur de l'existence d'une multitude de composés protéiques. On conçoit alors que la composition de la fraction protéique d'un trouble ne soit pas constante, mais évolue au fur et à mesure de sa formation. Cette hypothèse se justifie comme suit :

— Deux fractions d'une même bière, dont l'une est additionnée de quercétine (30 mg/l), sont soumises à l'oxydation peroxydasique standard. Les troubles, une fois formés, sont centrifugés, séchés, puis pesés. Le rendement en trouble obtenu en présence de quercétine est nettement plus élevé qu'en son absence (190 mg/l contre 102 mg/l). Dans ces conditions, l'analyse chromatographique de ces deux troubles (tableau I, colonnes a et b) révèle effectivement une divergence certaine de leur composition en acides aminés.

4°) Poids moléculaire des protéines.

Jusqu'à présent, on pensait généralement que, parmi les substances azotées, les molécules protéiques les plus volumineuses étaient responsables de la formation des troubles. Nos essais par dialyse et ultrafiltration nous amènent à réviser cette idée.

a) DIALYSE :

Nous avons séparé les grosses molécules d'une bière par dialyse en sac de collodion :

- le dialysat est ramené par évaporation sous vide à température ambiante au volume primitif mis en œuvre ;
- l'adialysable, complètement débarrassé de toute trace de dialysable par dialyse prolongée contre de l'eau distillée, est également

ramené au volume de la bière de départ par évaporation, puis centrifugé.

Ces deux fractions soumises à l'oxydation peroxydasique se comportent différemment.

Le dialysat, contrairement à toute prévision, est aussi sensible que la bière d'origine conservée à l'air pendant le temps de dialyse.

L'adialysable, quoique composé de macromolécules protéiques (on a vérifié que ces dernières sont précipitées par l'acide trichloracétique), est peu sensible. De plus, l'addition de quercétine ou de tanin gallique ne le sensibilise pratiquement pas. Ses protéines ne semblent donc pas jouer le rôle essentiel dans la formation des troubles d'oxydation peroxydasique. Enfin, si le sac en collodion est remplacé par un sac en cellophane beaucoup plus épais, la dialyse est plus lente, mais la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique du dialysat reste inchangée.

Ces résultats, systématiquement reproductibles, prouvent indiscutablement le fait très important que le trouble d'oxydation peroxydasique peut prendre naissance à partir de molécules suffisamment petites pour passer à travers un sac de dialyse. Leur poids moléculaire est donc sensiblement inférieur à 40 000.

b) ULTRA-FILTRATION :

Afin de connaître avec plus de précision le poids moléculaire approximatif des protéines dialysables, nous avons fait appel à des ultra-filtrations fractionnées sur des membranes filtrantes « Sartorius » de différentes porosités. Le filtrat reste sensible à l'oxydation pour toutes les membranes de porosité supérieure à celle de l'ultra-filtre Lsg 60, qui, selon le fabricant, ne laisse passer que les polypeptides de poids moléculaire inférieur à 15 000. Dans ce cas, bien qu'on n'obtienne plus de trouble par oxydation de l'ultra-filtrat, la coloration fonce néanmoins comme pour la bière.

De ce fait, il devient possible d'assurer que les substrats des bières susceptibles de former des troubles par oxydation peroxydasique sont des molécules relativement petites de poids moléculaires approximativement compris entre 15 et 40 000. Par suite, les gros polypeptides participent aux troubles au même titre que les protéines les plus petites.

Cependant, les polypeptides plus petits, de poids moléculaire inférieur à 15 000 traversant cette membrane Lsg 60, peuvent former des associations insolubles avec des tannoïdes condensés. C'est ainsi que l'addition de tanin gallique à l'ultra-filtrat provoque l'apparition d'un voile et,

après élimination de ce dernier par centrifugation, le liquide clair trouble par oxydation peroxydasique. En traitant l'ultra-filtrat par des doses croissantes de tanin, on peut même obtenir une courbe en cloche (fig. 34, courbe b) analogue à celle obtenue avec l'ensemble des protéines des bières (courbe a). La vitesse maximum de formation du trouble et la quantité nécessaire correspondante de tanin ajouté sont plus faibles que pour les bières, ce qui reflète une concentration bien moindre en polypeptides.

De la même façon, l'ultra-filtrat devient sensible en présence de quercétine. Les vitesses de formation du trouble sont encore ici bien atténuées par rapport à celle de la bière d'origine. Précisons enfin que les associations (polypeptides de poids moléculaire inférieur à 15 000) · (polyphénols ajoutés) sont de trop grande taille pour traverser l'ultra-filtre Lsg 60 bien qu'elles passent facilement à travers une membrane de dialyse.

III. — NATURE DES PROTEINES ET DEPLACEMENT DE L'EQUILIBRE P · T

A la lumière de ce qui vient d'être exposé au paragraphe précédent, le potentiel protéique d'une bière est constitué de protéines et de polypeptides fort divers, tant par leur affinité pour les tannoïdes que par leur composition en acides aminés. Ceci s'explique aisément par le fait que les protéines de l'orge, déjà fort nombreuses (la liste des holo et des hétéroprotéines s'enrichit chaque année de nouveaux représentants), subissent tout au long de l'élaboration du malt et de la bière, d'abord des dégradations dans lesquelles les actions enzymatiques dominent, puis des dénaturations sous l'influence combinée de la chaleur et des tanins.

En définitive, la bière se présente comme un milieu protéique tellement complexe qu'il devient difficile d'y caractériser des types de protéines définis et de préciser l'importance de leur contribution individuelle dans le mécanisme de formation des troubles.

C'est pourquoi il semble préférable de faire appel à des protéines pures définies et à des produits de synthèse s'en rapprochant par leurs propriétés voisines pour déterminer les divers modes d'action possibles des substances protéiques dans la formation d'associations P · T insolubles et dans les déplacements d'équilibre P · T. Nous sommes ainsi amenés à classer les protéines suivant leur mode d'action.

1°) **Protéines qui déplacent l'équilibre P.T dans le sens de la formation d'associations solubles.**

Ce sont nécessairement des protéines très solubles. Elles doivent, en effet, posséder des groupes —CO—NH— hydrophiles libres en grand nombre afin de pouvoir s'emparer des tannoïdes même associés, tout en conservant suffisamment de leurs fonctions libres pour maintenir les associations en solution.

a) **P. V. P. DE BAS POIDS MOLÉCULAIRE :**

Des produits synthétiques, tels que les P.V.P. de bas P.M. (12 000, 24 000, 40 000), peuvent répondre aux conditions précitées. Il est inutile de revenir sur leurs propriétés. Rappelons seulement que ces hauts polymères déplacent à leur profit, en formant des associations solubles, les tannoïdes oxydés susceptibles de précipiter les protéines des bières, et ce, d'autant plus que le P.M. de ces hauts polymères est faible.

Mais la nature des tannoïdes que l'on « offre » à ces molécules de P.V.P. conditionne aussi la solubilité des associations. Dans certains cas, où le tannoïde est extrêmement tannant, par exemple le tanin gallique, les affinités réciproques sont telles que les associations (P.V.P. de bas P.M.) - (tanin) peuvent ne plus contenir assez de fonctions hydrophiles libres pour rester en solution (fig. 8). Mais c'est là un cas limite et de façon systématique, on peut dire que les P.V.P. de bas P.M. déplacent les équilibres P · T vers la formation d'associations solubles.

En forte concentration, les P.V.P. de bas P.M. peuvent même s'associer si fortement avec les tannoïdes que l'oxydation de ces derniers se trouve partiellement inhibée. On décèle ce phénomène en enregistrant les courbes de transmission à 4 300 Å de bière ou de substrats polyphénoliques au cours de l'oxydation peroxydasique standard avec et sans P.V.P. 40. Dans la figure relative à l'oxydation du tanin gallique (fig. 35), la coloration en présence de P.V.P. 40 est nettement moins accusée. L'oxydation semble donc freinée.

b) **PROTÉINES PURES :**

Des protéines très solubles, telles que l'ovalbumine (P.M. 45 000) et la β lactoglobuline (P.M. 35 000), forment également, avec les tannoïdes des bières, des associations solubles. Mais, en tant que protéines naturelles, elles ne possèdent ni la richesse en groupes =CO libres, ni la répartition régulière de ces groupes, deux caractères qui font des P.V.P. de bas P.M. des substances douées d'une forte affinité pour les tannoïdes tout en préservant la solubilité des associations.

La concentration en tanin amenant la saturation des $>C = O$ libres doit être plus faible que pour la P.V.P. ; c'est pourquoi les protéines ont beaucoup moins tendance à donner avec les tannoïdes oxydés des associations solubles. Ainsi, l'oxydation peroxydasique des substrats (ovalbumine) - (quercétine) et (β lactoglobuline) - (quercétine) est suivie de la formation de troubles importants ; ceux-ci seront d'ailleurs étudiés en détail au cours de la quatrième partie de ce chapitre.

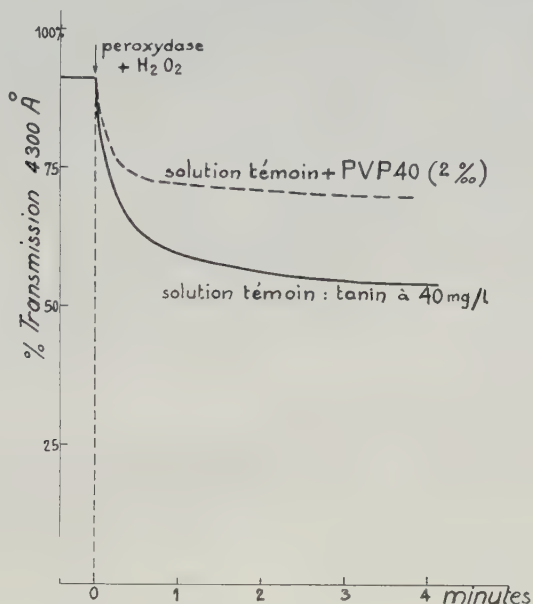


FIG. 35

Effet de la P.V.P. 40 sur la coloration (4300 Å) d'une solution de tanin gallique par oxydation peroxydasique.

C'est encore pour la même raison que ces protéines ne freinent pas aussi fermement que la P.V.P. 40 la formation des troubles d'oxydation peroxydasique des bières : alors que la P.V.P. 40 en solution à 0,2 ‰ dans une bière bloque toujours la formation des troubles d'oxydation, l'ovalbumine à 3 ‰ ne diminue la vitesse de formation des troubles que de 25 % et la β lactoglobuline de 9 % seulement.

2°) Protéines qui déplacent l'équilibre P.T dans le sens de la formation d'associations insolubles.

Certaines protéines, par leur simple addition à une solution polyphénolique, provoquent la séparation d'associations insolubles P.T. Ces

protéines peuvent être très solubles, peu solubles ou insolubles (suspensions).

a) PROTÉINES TRÈS SOLUBLES :

Citons seulement les produits synthétiques, tels que les P.V.P. de haut poids moléculaire (360 000 et 700 000), dont les propriétés ont déjà été passées en revue. On peut supposer que ces macromolécules, du fait de leur P.M. élevé, se présentent sous forme de pelote et qu'un grand nombre de groupes $=CO$ sont alors peu accessibles.

b) PROTÉINES PEU SOLUBLES :

Nous avons choisi, pour exemple, deux globulines animales : l' α globuline bovine et la β globuline bovine. L'addition de celles-ci à une bière provoque l'apparition de troubles. Après centrifugation, on constate que la vitesse d'oxydation peroxydasique du surnageant pratiquement inchangée lorsque la protéine ajoutée est l' α globuline bovine (à raison de 3 ‰) est multipliée par trois lorsque la protéine ajoutée est la β globuline bovine. On comprendra bientôt ce comportement.

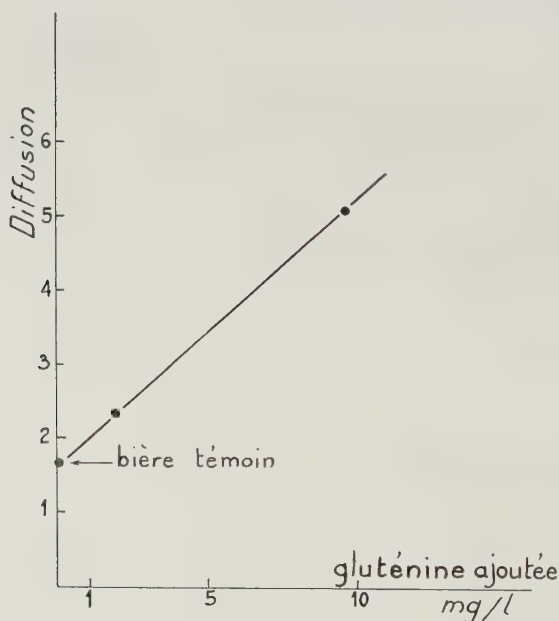


FIG. 36

Augmentation de diffusion d'une bière par addition de gluténine.

c) PROTÉINES INSOLUBLES :

On a choisi pour exemple deux protéines globulaires très peu solubles : la gluténine et l'édestine. On a préparé des suspensions à 0,01 % de ces protéines végétales dans l'eau tamponnée à pH 4. Ces suspensions légèrement opalescentes sont très stables puisqu'une ultracentrifugation prolongée à 25 000 g ne modifie pas leur concentration. L'addition de 5 gouttes de ces suspensions à 5 cm³ d'une bière, suffit pour doubler l'intensité de diffusion. Ces protéines déplacent donc très fortement l'équilibre P · T dans le sens de la formation d'associations insolubles (*figure 36*).

De plus, l'addition de quantités extrêmement faibles de ces protéines sensibilise la bière à l'oxydation peroxydasique (*figure 37*).

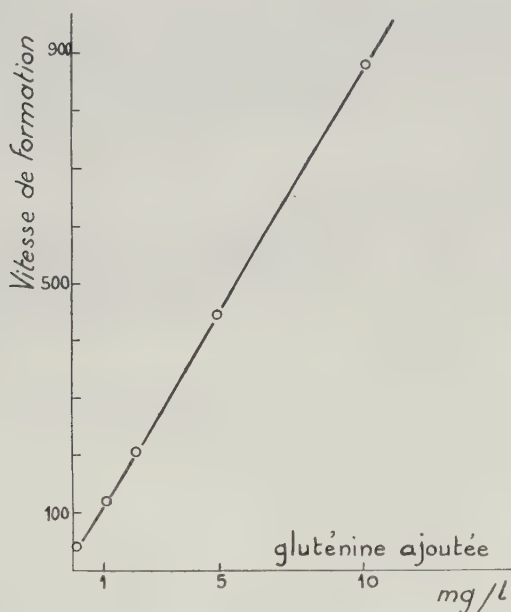


FIG. 37

Augmentation de la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique par addition de gluténine à une bière.

La sensibilisation se conserve, même après élimination du trouble provoqué par l'apport des protéines. C'est donc qu'une fraction des protéines insolubles ajoutées reste en équilibre avec les tannoïdes peu tannants, mais précipite les tannoïdes condensés par oxydation.

3°) Protéines qui déplacent l'équilibre par adsorption de T.

Ce sont évidemment des substances très peu solubles, utilisées à dose relativement élevée.

a) PRODUITS DE SYNTHÈSE :

Le nylon 6 · 6 est bien connu pour la protection préventive des bières contre la formation de voiles (HARRIS). Si l'on agite la bière avec une quantité déterminée de poudre de nylon 6 · 6 pendant quelques minutes, puis qu'on centrifuge, on constate que le seuil à la P.V.P. et la vitesse d'oxydation de la bière traitée subissent des diminutions fonction de la quantité de polyamide utilisée.

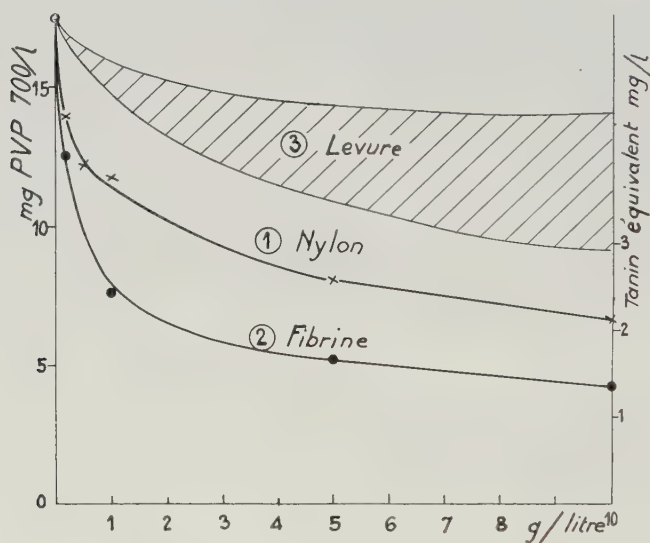


FIG. 38

Effet de doses croissantes de :

- 1) nylon 6 · 6,
- 2) fibrine,
- 3) levure,

sur la quantité de tannoïdes restant à l'équilibre dans une bière.

La courbe 1 de la *figure 38* montre l'effet de doses croissantes de nylon 6 · 6 sur la quantité de tannoïdes restant à l'équilibre dans une bière, exprimés en tanin équivalent et la courbe 1 de la *figure 39* exprime les vitesses d'oxydation affaiblies correspondantes.

b) PROTÉINES FIBREUSES :

Si l'on agite la bière avec une petite quantité d'une protéine fibreuse telle que la fibrine (ou l'élastine), pendant quelques minutes, on obtient

le même résultat qu'avec une polyamide (*figure 38*, courbe 2, et *figure 39*, courbe 2), mais pour des quantités beaucoup plus faibles ; la fibrine présente, à masse égale, un pouvoir adsorbant beaucoup plus grand que le nylon 6 · 6.

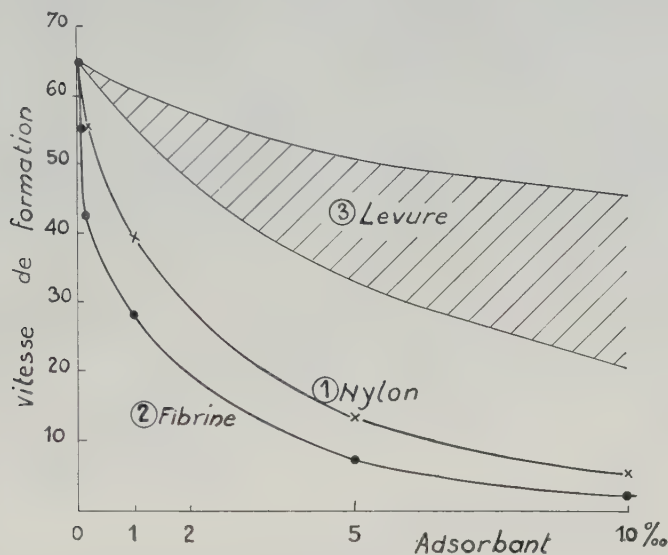


FIG. 39

Effet de doses croissantes de :

- 1) nylon 6 · 6,
- 2) fibrine,
- 3) levure,

sur la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique.

L'analogie d'action de la fibrine, de l'élastine et du nylon n'a rien de surprenant. Qu'à masse égale, l'activité de la fibrine soit supérieure à celle du nylon s'explique aisément : dans le nylon, les liaisons peptidiques se trouvent, en grande partie, réciproquement saturées par les liaisons hydrogène qui assurent la cohésion des macromolécules entre elles dans les fibres ; dans la fibrine (et l'élastine), il y a relativement plus de ces groupements libres ou accessibles.

c) PROTÉINES DÉNATURÉES PAR VOIE THERMIQUE :

La dénaturation thermique des albumines conduit généralement à leur coagulation. Ainsi, l'ovalbumine en solution dans l'eau s'insolubilise rapidement par chauffage à 60°. Si l'expérience est faite sur une solution d'ovalbumine dans la bière, la phase solide « floconneuse » qui apparaît entraîne une proportion importante des tannoïdes. Le dosage de ces

derniers à la P.V.P. 700 après séparation de l'insoluble, ainsi que la faible vitesse d'oxydation peroxydasique en font foi. Cet exemple illustre combien la dénaturation d'une protéine peut transformer ses propriétés. Ici, l'ovalbumine qui initialement déplaçait l'équilibre P · T dans le sens de la formation d'associations solubles, devient après traitement un adsorbant des tannoïdes.

d) LEVURES :

Le caractère protéique des parois cellulaires des levures explique que ces dernières déplacent les tannoïdes par adsorption au même titre que les protéines fibreuses quoique plus faiblement (*figure 38*, courbe 3, et *figure 39*, courbe 3), pour un même pourcentage de matière sèche.

Les courbes d'adsorption sont ici remplacées par des bandes qui correspondent à un éventail de levures dont les pouvoirs d'adsorption sont très différents. En effet, nous avons montré par ailleurs (56), que le pouvoir d'adsorption est fonction de la nature, de l'état et des conditions de culture de la levure. Le pourcentage de cellules mortes joue notamment un rôle de premier plan.

Si la suspension de levure est soumise à l'action d'un faisceau d'ultrasons, celui-ci provoque l'éclatement d'un pourcentage élevé de cellules. Les membranes cellulaires centrifugées et lavées à l'eau pour éliminer le protoplasme ont alors un pouvoir d'adsorption bien supérieur à celui des levures intactes, car elles offrent aux tannoïdes une surface plus étendue.

La dénaturation thermique (chauffage à 65° pendant cinq minutes seulement) accroît également de façon considérable le pouvoir adsorbant des levures.

d) ISOTHERMES D'ADSORPTION :

Les substances adsorbantes précédentes ajoutées à une bière entrent en compétition avec les protéines du milieu pour fixer les tannoïdes. Une partie de ceux-ci est ainsi déplacée par l'adsorbant et il s'établit finalement un nouvel équilibre P · T dans la bière. La question se pose maintenant de connaître la relation entre la quantité de tannoïdes adsorbés et la concentration de ceux qui restent en solution.

Nous avons opéré de la façon suivante :

Soit une bière dont la concentration en tannoïdes déterminée par le seuil de précipitation à la P.V.P. 700 est t. Après une première adsorption par une quantité donnée d'un des produits cités, la fibrine par exemple (5 mn d'agitation) (200 mg/20 cm³ de bière), suivie

d'une filtration sous vide sur verre fritté n° 4, on mesure la nouvelle concentration x en tannoïdes de la bière. On connaît ainsi la quantité de tannoïdes adsorbés ($t - x$) en fonction de la concentration x de tannoïdes à l'équilibre en solution. Puis la fibrine récupérée par filtration est réutilisée pour une nouvelle adsorption sur la bière d'origine, dans les mêmes conditions ($250 \text{ mg}/20 \text{ cm}^3$). Après traitement, la concentration x_1 de tannoïdes à l'équilibre est supérieure à x et la fibrine déjà partiellement encombrée de tannoïdes a adsorbé au total une quantité de tannoïdes égale à $2t - (x + x_1)$.

Plusieurs adsorptions successives réalisées de cette façon avec la fibrine et le nylon, permettent de tracer les isothermes d'adsorption en portant en ordonnée les quantités de tannoïdes adsorbés : $(i + 1) \cdot t - (x + x_1 + \dots + x_i)$ et en abscisse les concentrations à l'équilibre des tannoïdes en solution x_i , i étant le numéro d'ordre de l'adsorption. Dans ces conditions, on obtient les courbes suivantes (figure 40).

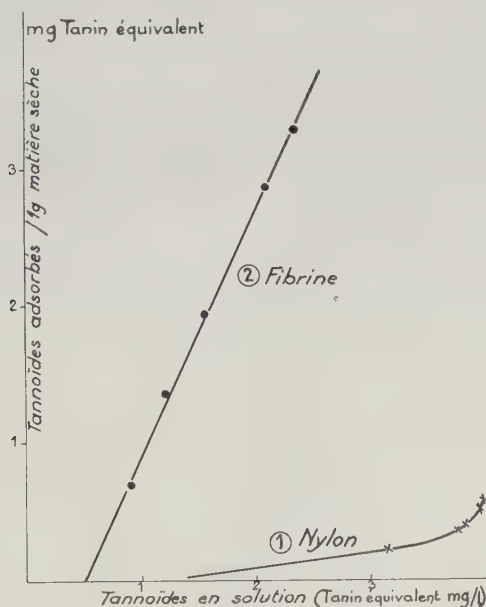


FIG. 40

Isothermes d'adsorption des tannoïdes :

- 1) par le nylon,
- 2) par la fibrine.

Les quantités de tannoïdes adsorbés sont proportionnelles aux concentrations de tannoïdes à l'équilibre :

$$(i + 1) \cdot t - (x + x_1 + \dots + x_i) = k \cdot x_i$$

où k est une constante de valeur élevée pour la fibrine, faible pour le nylon. On est donc en présence d'isothermes d'adsorption de Langmuir en solution très diluée.

Cependant, on remarque un décalage à l'origine. Cela peut être dû au fait que ce que nous appelons tannoïdes précipitables groupe un mélange de substances dont les affinités ne sont pas nécessairement identiques pour la P.V.P. d'une part, et pour les protéines d'autre part.

IV. — NATURE DES PROTEINES ET pH OPTIMUM DE FORMATION D'ASSOCIATIONS P.T INSOLUBLES

L'incidence de la nature des tannoïdes sur le pH optimum de formation d'associations P.T insolubles ayant été démontrée, il reste à savoir si ce pH dépend également de la nature des protéines. On a utilisé dans ce but des substrats (protéine pure + quercétine) amenés à des pH allant de 3 à 6 par addition de quantités identiques (les plus faibles possibles pour éviter l'augmentation de μ) de solutions-tampons de Mac ILVAINE (0,25 cm³ de tampon pour 5 cm³).

En ce qui concerne les protéines et la quercétine, des concentrations extrêmement faibles suffisent pour constituer un substrat susceptible de présenter par oxydation peroxydasique, un trouble aussi important que ceux des bières. On s'est ainsi fixé des concentrations de 13 mg/l de protéine et de 20 mg/l de quercétine.

Précisons toutefois que l'oxydation peroxydasique standard de telles solutions renfermant un seul polyphénol simple et une molécule protéique de nature connue, entraîne l'apparition de troubles dont la ressemblance avec ceux des bières n'est pas absolue. En effet, pour une même intensité de diffusion finale, la vitesse de formation des troubles d'oxydation à partir de produits purs est bien supérieure à celle des bières (*figure 41*) et tend plus rapidement vers la limite.

On peut attribuer cette différence de comportement à la complexité des réserves polyphénoliques et protéiques de la bière. L'oxydation des différents tannoïdes des bières n'est vraisemblablement pas simultanée et conduit à une multitude de produits d'oxydation d'affinités très variables pour les multiples protéines et polypeptides présents. Les

associations se créent successivement alors que la quercétine oxydée s'associe immédiatement à la seule protéine qu'on lui offre. Il ne faudrait donc pas vouloir établir un lien trop étroit entre les vitesses de condensation élevées de tels substrats et celles des bières. Malgré cette réserve, l'analogie de comportement des associations (protéines) · (quercétine oxydée), d'une part, et P · T des bières, d'autre part, est très satisfaisante.

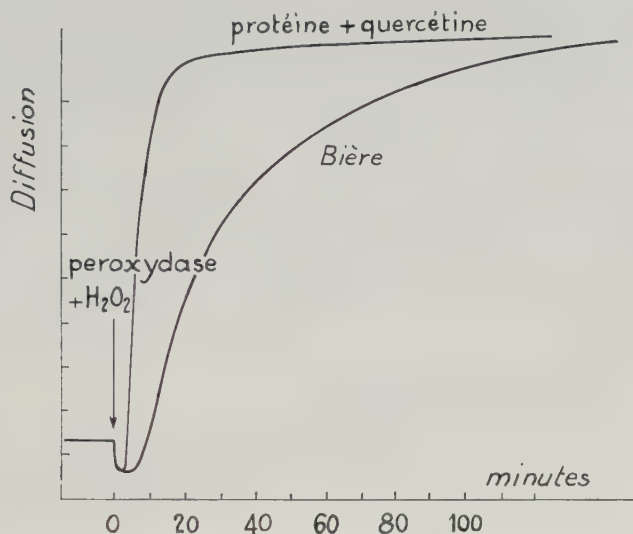


FIG. 41

Formation comparée de troubles d'oxydation peroxydasique d'une bière et d'un substrat (protéine + quercétine).

1°) Protéines solubles formant avec la quercétine des associations solubles.

Nous avons soumis aux essais des protéines très solubles, telles que l'ovalbumine et la β lactoglobuline dont on sait qu'elles forment avec les tannoïdes des bières des associations solubles. Les associations qu'elles donnent avec la quercétine sont également solubles quel que soit le pH. La figure 42 relative à l'oxydation peroxydasique standard des substrats contenant ovalbumine et β lactoglobuline en fonction du pH met deux faits en relief.

a) Les associations (ovalbumine) · (quercétine oxydée) sont beaucoup plus solubles que les associations (β lactoglobuline) · (quercétine

oxydée). Ceci est en parfait accord avec les résultats obtenus en présence des tannoïdes des bières. Cependant, il est à noter l'importance des composés polyphénoliques : les vitesses d'oxydation sont ici bien supérieures à celles obtenues avec les tannoïdes des bières.

b) Le pH optimum de formation d'associations insolubles (protéines) (quercétine oxydée) varie avec la nature de la protéine soluble ; il est plus faible pour l'ovalbumine que pour la β lactoglobuline.

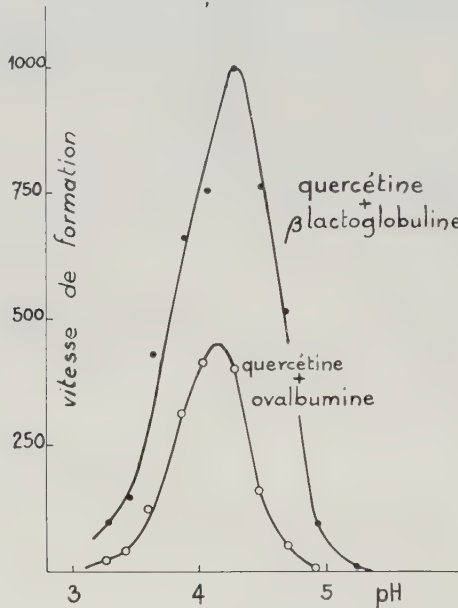


FIG. 42

Effet de la nature de la protéine sur le trouble d'oxydation peroxydasique.

2°) Protéines dont les associations avec la quercétine sont peu solubles.

Considérons de nouveau les protéines peu solubles (α globuline bovine et β globuline bovine) et très peu solubles (gluténine et édestine) qui précipitent toutes plus ou moins fortement les tannoïdes des bières.

a) α GLOBULINE BOVINE ET β GLOBULINE BOVINE :

Ces globulines sont suffisamment solubles pour que leurs solutions à 1 ‰ soient très limpides. Cependant, l'addition de ces protéines à la quercétine (1 goutte de solution de protéine/5 cm³ de la solution de quercétine) est suivie de l'apparition instantanée d'un trouble.

La mesure des troubles en fonction du pH des solutions permet de déterminer les pH de solubilité minimum des associations (α globuline bovine) · (quercétine) et (β globuline bovine) · (quercétine) (figure 43, courbes en pointillé).

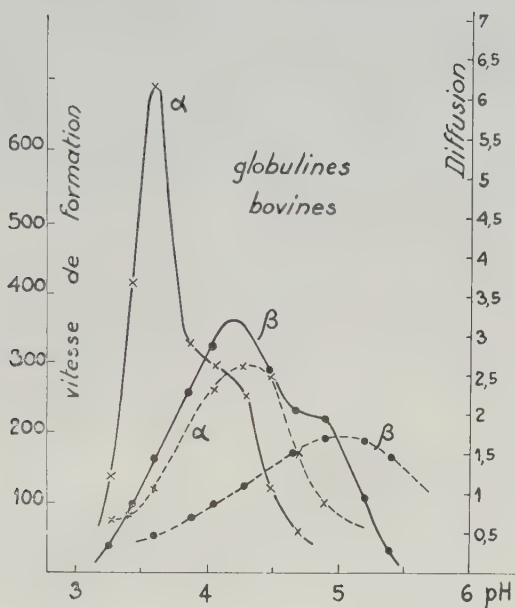


FIG. 43

En pointillés : effet du pH sur l'intensité du trouble donné par l'association (globulines bovines) · (quercétine).

En trait plein : variations correspondantes des vitesses de formation des troubles d'oxydation peroxydasique en fonction du pH.

Ces pH dépendent là encore de la nature de la protéine. Quant à la solubilité des associations au pH optimum, elle est à peu près du même ordre de grandeur pour l' α globuline bovine et la β globuline bovine.

Les courbes en trait plein de cette figure 43 représentent les vitesses de formation des troubles d'oxydation peroxydasique standard des substrats (α globuline bovine) · (quercétine) et (β globuline bovine) · (quercétine) portés aux divers pH. On remarque que par oxydation, le pH de solubilité minimum des associations (protéine) · (quercétine) se

trouve déplacé vers des valeurs plus faibles de 0,7 unité pH environ dans les deux cas. De plus, les courbes en cloche présentent un accident pour les pH de solubilité minimum des associations (protéines) · (quercétine). On est tenté d'interpréter cette anomalie par l'existence de traces de substrats d'origine non oxydés ou tout au moins peu modifiés par l'oxydation ; on a vu, en effet, que la condensation des polyphénols par oxydation peut être partiellement inhibée si ces derniers sont fortement engagés dans des associations, par exemple avec la P.V.P. 40. Ce pourrait être le cas ici, les protéines jouant le rôle de la P.V.P. 40 à un degré moindre.

Enfin, bien que la vitesse maximum d'oxydation peroxydasique du substrat (α globuline bovine) - (quercétine) soit deux fois plus élevée que celle du substrat (β globuline bovine) - (quercétine), la sensibilisation des bières par l' α globuline bovine est inférieure à celle qu'entraîne la β globuline bovine. Cela tient au fait qu'au pH des bières (voisin de 4,2), c'est bien la β globuline bovine qui présente la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique la plus élevée.

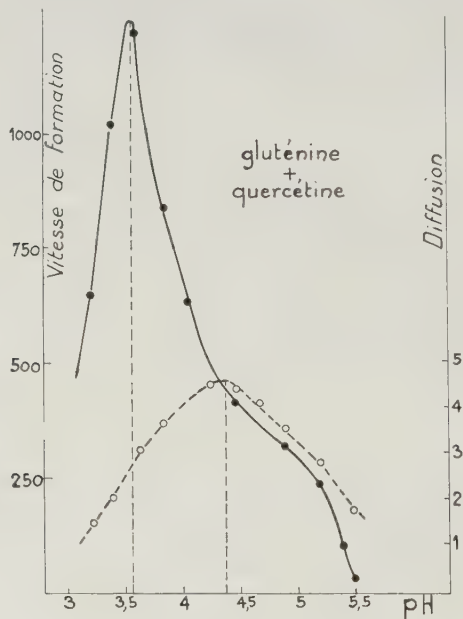


FIG. 44

En pointillés : effet du pH sur l'intensité du trouble donné par l'association (gluténine) - (quercétine).

En trait plein : variation correspondante de la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique.

b) GLUTÉNINE ET ÉDESTINE :

Les mêmes essais ont été faits avec l'édestine et la gluténine en suspensions stables.

Les figures 44 et 45 comprennent, d'une part, en pointillé, les courbes de solubilité des associations (gluténine) - (quercétine) et (édestine) - (quercétine) en fonction du pH, d'autre part, en trait plein, les courbes de vitesse de formation des troubles obtenus par oxydation peroxydasique de ces substrats. La solubilité des associations (protéine) - (quercétine) est ici beaucoup plus faible, ce que l'on comprend fort bien puisqu'elle est, en grande partie, commandée par celle minime des protéines. Il suffit de relativement peu de tannoïdes pour entraîner l'insolubilité de l'association.

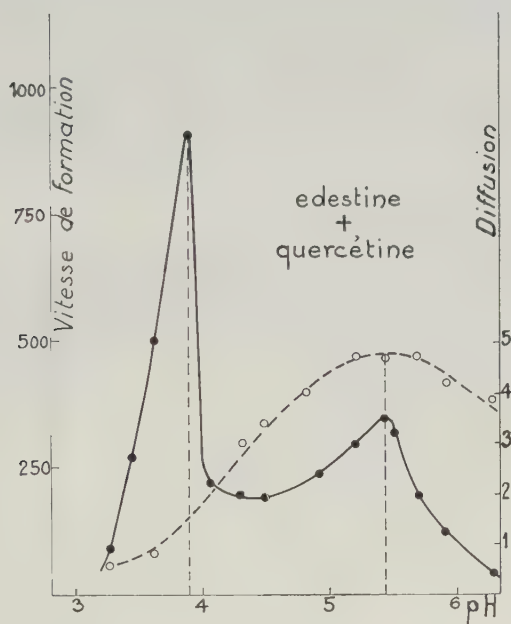


FIG. 45

En pointillés : effet du pH sur l'intensité du trouble donné par l'association (édestine) - (quercétine).

En trait plein : variation correspondante de la vitesse de formation du trouble d'oxydation peroxydasique.

En ce qui concerne la gluténine, l'oxydation peroxydasique provoque le même décalage de 0,7 unité pH et des vitesses de formation de trouble très élevées.

Le comportement de l'édestine diffère par l'écart beaucoup plus grand des pH optima (1,56 unité pH) et par l'allure de la courbe d'oxydation qui présente un second maximum pour le pH de solubilité minimum des associations (édestine) - (quercétine). On pourrait penser à la dispersion de l'édestine. Mais ce n'est pas le cas, puisque ce phénomène ne se produit pas si le polyphénol associé est la catéchine. On est donc conduit à penser que l'affinité de l'édestine pour la quercétine est telle qu'elle en fixe fortement certaines molécules au point de freiner et même de bloquer l'oxydation. On conçoit alors que les agrégats (édestine) - (quercétine) peu oxydés puissent être responsables de la forme de la courbe au voisinage de pH 5,4. La double incidence de la nature de la substance protéique et de la nature du composé polyphénolique qu'on lui offre sur la solubilité des associations est, dans ce cas, encore plus évidente.

V. — CARACTERE MULTIFONCTIONNEL DES TANNOIDES ET DES PROTEINES

1°) *Caractère multifonctionnel des tannoïdes.*

Jusqu'à présent, nous avons considéré que le trouble correspondant au seuil de précipitation à la P.V.P. 700 est uniquement formé d'associations P.V.P. 700 · T. En fait, s'il en était ainsi, l'analyse chromatographique de ce trouble ne donnerait pas naissance aux acides aminés figurant dans la colonne c du tableau I. Or, ces acides aminés représentent 27 % du trouble. Leur répartition rapportée à un pourcentage total d'azote récupéré voisin de 95 % (colonne d) est assez différente de celle des acides aminés du trouble d'oxydation peroxydasique de la même bière, notamment en ce qui concerne l'acide glutamique moins abondant.

Les tannoïdes déplacés par la P.V.P. 700 entraînent donc avec eux un cortège de protéines de la bière. De ce fait, ils sont multifonctionnels et peuvent servir de ponts entre P.V.P. 700 et protéines et *a fortiori* entre protéines diverses.

2°) *Caractère multifonctionnel des protéines.*

Le traitement par le tanin gallique d'une bière ayant subi une oxydation peroxydasique préalable provoque la formation d'un précipité fortement coloré. Quant au surnageant limpide obtenu par centrifugation,

il est considérablement éclairci. Ce phénomène, particulièrement net pour une bière ayant subi une oxydation peroxydasique, vaut également pour une bière quelconque. Une précipitation au tanin provoque toujours un éclaircissement de la bière.

Pour comprendre ces deux faits complémentaires, on doit admettre que le tanin précipite non pas des protéines libres, mais des associations préexistant en solution entre ces dernières et des polyphénols déjà condensés et fortement colorés qui se trouvent ainsi entraînés. Par conséquent, on peut avancer que les protéines sont multifonctionnelles : elles peuvent jouer le rôle de ponts entre molécules de tannoïdes différents, au même titre que les tannoïdes servent de ponts entre molécules de protéines.

Ainsi, la phase insoluble qui résulte d'un déplacement d'équilibre $P \cdot T$ est constituée d'agrégats complexes contenant chacun plusieurs molécules de protéines et de tannoïdes enchevêtrées.

TROISIEME PARTIE

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

I. — APPAREILLAGE

Tous les essais rapportés dans ce travail ont été effectués avec un diffracto-absorptiomètre enregistreur construit au laboratoire, dont nous indiquons les caractéristiques essentielles et les conditions d'emploi.

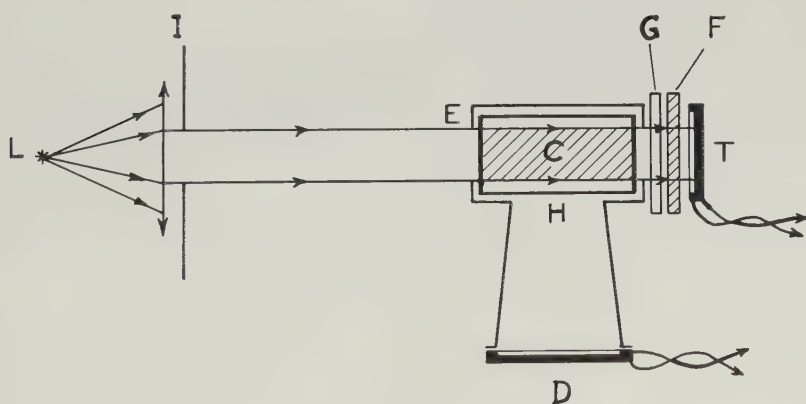


FIG. 46

Schéma du dispositif expérimental.

Il est schématiquement représenté par la *figure 46*. Un faisceau parallèle de lumière blanche issu d'une lampe de 30 W (L), à filament ramassé, alimentée par une tension stabilisée de 6 volts, peut être amené à l'intensité convenable au moyen d'un diaphragme iris (I). Il est limité par un diaphragme circulaire de 8 mm de diamètre (E), placé contre la face d'entrée de la cuve parallélépipédique (C) 20 × 10 × 40 mm. A la sortie de la cuve, il traverse des écrans atténuateurs gris neutre (G),

un filtre interférentiel $4\,300\text{ \AA}$ (F) et tombe sur une cellule à couche d'arrêt (T). Le courant débité par celle-ci est mesuré par un galvanomètre antivibratoire à plusieurs sensibilités (maximum : $1,5 : 10^{-9}\text{ A/mm}$, résistance interne : 670 ohms). Les déviations sont enregistrées à l'aide d'un suiveur de spot (SEFRAM) et donnent directement la transmission.

On choisit une valeur arbitraire constante pour le 100 de transmission que l'on ajuste à l'aide du diaphragme (I).

La lumière diffusée à 90° est mesurée par une autre cellule à couche d'arrêt (D) (surface utile $16 \times 16\text{ mm}$, distance cuve - cellule 20 mm , fenêtre (H) $(10 \times 13\text{ mm})$).

Un inverseur permet de brancher une cellule ou l'autre sur le galvanomètre dont les déviations sont très sensiblement proportionnelles aux intensités lumineuses reçues par les cellules.

II. — MESURE DE L'INTENSITE DES TROUBLES

Avec cet appareillage relativement simple, il est facile de suivre, au cours du temps, la variation de l'intensité lumineuse diffusée par une solution. Que la diffusion soit due à la présence d'une phase dispersée prenant naissance spontanément (trouble naturel) ou résultant de l'addition d'un réactif convenable (trouble artificiel), l'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle à la quantité de matière dispersée. Cela a été vérifié par HARRIS. Il faut souligner que, dans tout ce travail, nous nous sommes intéressés presque exclusivement *aux variations de l'intensité de la lumière diffusée donc aux variations de la quantité de trouble* et non à sa valeur absolue. Nous n'avons pas toujours fait intervenir de correction pour tenir compte de la coloration ou de la turbidité du milieu. Cette façon de procéder est justifiée par plusieurs arguments :

1°) Les colorations des différents échantillons utilisés (bières pâles) sont suffisamment voisines pour qu'on puisse comparer directement les courbes obtenues.

2°) La sensibilité de l'appareillage nous permet d'étudier la *phase initiale* de formation du trouble, alors que l'absorption de lumière qu'il provoque est encore négligeable.

3°) La netteté des phénomènes est telle qu'une correction n'apporterait pas d'avantages supplémentaires.

4°) Une étude quantitative par néphélométrie ne se justifie pas tant que les phénomènes sont encore qualitativement mal connus. Même si

l'on introduisait les corrections pour tenir compte de la coloration, il resterait une inconnue très difficilement accessible liée aux propriétés de la phase dispersée (forme, taille des particules) qui varient avec leur nature.

Pour donner cependant un ordre de grandeur numérique à nos expériences, nous avons exprimé les diffusions en « unités Formazine ».

Deux unités Formazine dans l'eau correspondent sensiblement à 150 millimètres de déplacement du spot sur l'enregistrement, à la sensibilité maximale.

Unité de trouble « Formazine E. B. C. ».

On obtient les solutions standards de troubles « Formazine », dont les caractéristiques de simplicité, de stabilité et de reproductibilité répondent aux exigences de la néphélométrie, en utilisant la méthode de JANSEN (46) dont nous rappelons l'essentiel, en raison de sa commodité :

1°) Préparer une solution de sulfate d'hydrazine à 1 % dans de l'eau distillée ; attendre 4 heures avant l'emploi.

2°) Préparer une solution à 10 % d'hexaméthylène tétramine (Formine) dans de l'eau distillée.

3°) Ajouter un volume de la solution de sulfate d'hydrazine à un égal volume de solution de formine, pour préparer le « concentré de trouble formazine ». Abandonner au repos 24 heures au moins avant l'emploi, afin d'assurer la formation complète du trouble.

4°) Diluer un volume du « concentré de trouble formazine » à dix volumes, avec de l'eau distillée, pour obtenir la dispersion correspondant à 100 unités de trouble E. B. C. (Formazine 100).

5°) A partir de la Formazine 100, on prépare d'autres dilutions, soit dans l'eau, soit dans la bière.

On peut conserver les dispersions :

— « concentré de trouble formazine » au maximum deux à trois mois ;

— « Formazine 100 » et ses dilutions dans l'eau : au maximum une semaine ;

— ses dilutions dans la bière : au maximum cinq à six heures.

III. — MESURE DE LA VITESSE DE FORMATION DES TROUBLES

a) Lorsqu'on ajoute en quantité convenable et *en une seule fois*, un réactif générateur de trouble à une bière, il s'y développe un voile. L'intensité de la lumière diffusée croît en fonction du temps et tend vers une limite qui peut être atteinte en quelques minutes ou seulement après plusieurs heures.

La cinétique de formation du trouble est essentiellement variable selon le réactif et sa concentration, ainsi que le type de bière.

La vitesse avec laquelle le trouble se développe dans les premiers instants peut décroître de façon continue comme c'est le cas avec le tanin

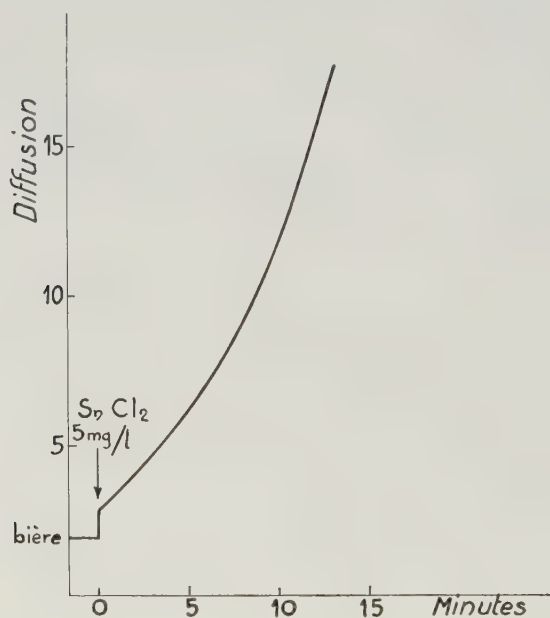


FIG. 47
Formation d'un trouble par les ions Sn^{++} (5 mg de Sn Cl_2 par litre de bière), phase initiale seulement.

gallique (voir *figure 20*) et le D.C.I. (fig. 48). Elle peut croître progressivement, passer par un maximum et décroître comme c'est le cas avec les ions Sn^{++} (fig. 47) et l'oxydation peroxydasique (fig. 12). Dans ce cas, la courbe de diffusion en fonction du temps présente une forme en S.

Comment définir dans un régime variable une vitesse de formation du trouble permettant des mesures comparatives ?

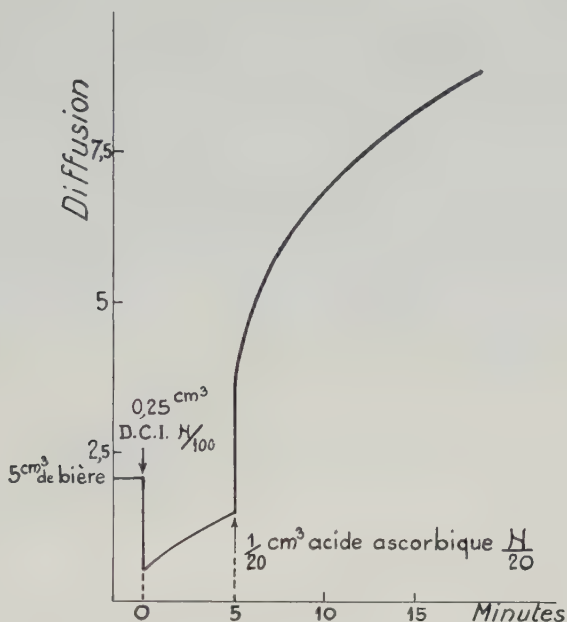


FIG. 48

Formation du trouble d'oxydation au D.C.I.

L'oxydation est arrêtée après 5 minutes par addition d'acide ascorbique qui détruit l'excès de D.C.I.

Comme ce sont les valeurs relatives qui nous intéressent, et non les valeurs absolues, il suffit de choisir arbitrairement un point sur la courbe où l'on tracera la tangente. Si la courbe présente un point d'inflexion, on peut prendre la tangente en ce point, sinon, on trace la tangente à la courbe après un temps convenablement choisi.

Ici, il convient de souligner un point très important qui justifie la technique d'étude utilisée. *En première approximation et à l'intérieur d'une même série d'essais, la vitesse de formation du trouble varie dans le même sens que la quantité de trouble limite. Ainsi, la vitesse de formation du trouble est un indice de la quantité maximum de trouble qui peut apparaître par addition d'une dose donnée de réactif. Cette vitesse varie en raison inverse de la solubilité du trouble.*

En choisissant convenablement les paramètres (vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur et quantité de réactif), on peut ainsi

établir très rapidement une courbe représentant à un facteur près les variations de solubilité d'un trouble particulier en fonction d'une variable, le pH par exemple.

b) Lorsque le réactif générateur de trouble est introduit à vitesse constante dans la bière, il faut assurer en permanence le mélange par une agitation efficace et continue : c'est le rôle de l'agitateur magnétique utilisé. Le réactif arrive par un capillaire de verre plongeant jusqu'au fond de la cuve dans un angle hors du faisceau lumineux. Il est injecté à vitesse constante par un appareil à perfusion (BRAUN) dont les douze vitesses permettent toutes les combinaisons utiles. Dans ce cas, on peut encore choisir arbitrairement une vitesse de formation du trouble sur la courbe enregistrée. Mais la méthode n'est intéressante que lorsque la vitesse d'injection est suffisamment faible pour qu'à tout instant l'équilibre *soit pratiquement réalisé entre la phase dispersée* qui prend naissance et la phase liquide.

IV. — DOSAGE DES TANNOIDES

Dans ce cas particulier, la méthode néphélométrique permet un dosage précis.

Le trouble obtenu par addition à la bière de polyvinylpyrrolidone de P.M. = 700 000 possède des caractéristiques particulières que nous avons utilisées comme base d'une méthode originale de dosage des tannoïdes des bières.

Il suffit de préciser ici dans cette partie expérimentale, que la polyvinylpyrrolidone de poids moléculaire 700 000, en solution aqueuse à 0,2 g/litre, est injectée *à la vitesse constante* de 1 cm³/h suffisamment faible pour que l'équilibre entre trouble et phase liquide soit réalisé. La vitesse de déroulement du papier d'enregistrement est, en général, de 72 mm/h. La courbe de diffusion présente un maximum aigü dont l'abscisse, correspondant à une quantité définie de P.V.P., peut être utilisée pour caractériser la concentration des tannoïdes.

RESUME ET CONCLUSIONS

Les techniques classiques de préparation de solutions homogènes et stables de protéines végétales comportent généralement l'élimination des fractions qui refusent de se redissoudre après chaque précipitation fractionnée ou qui apparaissent spontanément au cours du temps en très petite quantité dans les solutions primitivement limpides. L'apparition d'une phase grossièrement dispersée est un important obstacle à l'étude physico-chimique des sols de protéines.

Aussi, nous sommes-nous intéressés spécialement aux substances insolubles qui prennent naissance dans les solutions diluées de protéines eau et sel solubles de l'orge. Nous avons précisé leurs caractéristiques, puis nous avons étendu cette étude à d'autres protéines. Ce sont les conclusions générales auxquelles nous sommes arrivés que nous avons rassemblées ci-dessous :

1°) Il arrive fréquemment que les solutions de protéines végétales (P) soient souillées *par de petites quantités de produits polyphénoliques*. Ces deux classes de substances existent simultanément dans les tissus végétaux, localisées à des endroits différents et viennent en présence au cours des processus d'extraction, lors du broyage de la matière première de départ et de la mise en solution. Dès ce moment, elles réagissent l'une sur l'autre.

2°) L'oxydation par l'oxygène de l'air, enzymatique ou non, de très nombreux composés polyphénoliques *conduit à des produits condensés* doués de propriétés tannantes que nous avons appelés tannoïdes symbolisés par T.

3°) L'oxydation peroxydasique (H_2O_2 + peroxydase) est un moyen commode pour réaliser dans un délai de quelques minutes la formation de tannoïdes *aux dépens de très nombreux corps polyphénoliques simples*. Lorsque l'oxydation progresse, le pouvoir tannant croît, passe par un maximum, puis diminue.

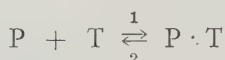
4°) Les tannoïdes solubles ainsi formés réagissent aisément sur les substances de nature protéique pour donner des associations P · T dont la *solubilité est toujours inférieure* à celle de la protéine initiale.

5°) Ces associations réagissent aux variations de pH et μ comme des protéines. Elles ont notamment un pH_i dépendant à la fois de la nature de la protéine et de celle du tannoïde. Ce pH_i tombe le plus souvent dans le domaine compris entre 3,5 et 5.

6°) Les forces assurant la liaison entre les deux partenaires P et T sont essentiellement dues à des liaisons hydrogène prenant naissance entre les —CO—NH— peptidiques et les —OH phénoliques. Cela découle de l'étude de l'action de solutions étendues de P.V.P. sur les associations P · T.

7°) Les liaisons hydrogène entre P et T existent aussi bien en solution, où nous avons démontré l'existence d'associations P · T solubles, que dans la phase de dispersion grossière. De telles liaisons déterminent l'adsorption des tannoïdes sur les protéines insolubles ou des produits analogues (superpolyamides, nylon par exemple).

8°) On est amené à envisager l'existence d'équilibres entre P et T que l'on peut formuler ainsi :



Il est bien entendu qu'il ne s'agit pas d'équilibres réversibles au sens thermodynamique, mais plutôt d'équilibres d'adsorption.

9°) L'association P · T n'a pas une composition fixe. Le rapport P/T peut varier dans des limites assez larges non seulement avec la nature de P et T, mais aussi avec leurs concentrations relatives.

10°) Lorsque P est insoluble (nylon), on a montré qu'un chauffage progressif suffit à désorber une quantité croissante de la fraction T. Si la température diminue, l'adsorption augmente. On peut alors considérer qu'un accroissement de température déplace l'équilibre dans le sens de la flèche 2, alors qu'un abaissement de température a l'effet inverse. Un tel déplacement est valable également même si P est soluble : expériences avec la P.V.P. de faible P.M.

11°) La diminution de solubilité d'une protéine sous l'effet de concentrations très basses de tannoïdes résulte de la diminution progressive du nombre de groupements polaires libres solvatés qu'elle renferme, consécutive à l'entrée de ces groupements dans des liaisons hydrogène avec les —OH phénoliques, avec élimination corrélative de l'eau de solvation.

12°) Les associations d'adsorption insolubles qui prennent naissance évoluent spontanément dans le temps. Le vieillissement diminue leur solubilité de sorte que leur passage en solution exige des températures de plus en plus élevées ou la mise en œuvre de réactifs plus concentrés (P.V.P.). On explique ainsi l'irréversibilité partielle (au sens précédent)

rencontrée au cours de la préparation de certaines fractions protéiques par précipitations et dissolutions successives.

13°) L'augmentation de la cohésion de la phase insoluble par vieillissement peut s'expliquer par *multiplication du nombre des liaisons hydrogène* dans la phase condensée, par *formation de liaisons covalentes* (surtout quand il y a oxydation) et par *accroissement de la masse micellaire* qui diminue le rapport (surface/volume) des associations.

14°) La possibilité de formation d'associations peu solubles à partir de gros polypeptides, et non pas seulement aux dépens de macromolécules protéiques, *fait jouer à la structure relative des constituants P et T* un rôle plus important que la masse moléculaire.

15°) Le fait que la condensation oxydative de très nombreux composés polyphénoliques simples conduise à des substances douées de propriétés tannantes, implique que cette *caractéristique est commune à des structures condensées extrêmement variées*, comparable à la diversité des molécules polypeptidiques. Il est probable que les associations $P \cdot T$ qui satisfont les affinités du plus grand nombre de groupements intéressés prennent naissance de préférence.

Cependant, en raison de l'inertie liée à la rigidité et à l'encombrement des édifices et aussi aux positions relatives des groupements $-\text{CO}-\text{NH}-$ et $-\text{OH}$, il est probable que les structures les plus stables ne sont pas atteintes d'emblée. L'évolution des propriétés physiques de l'association $P \cdot T$ constatée au cours du vieillissement naturel, accélérée par des températures élevées qui augmentent le degré de liberté des groupements réactifs et facilitent les réarrangements internes, n'est que le reflet des transformations tendant à diminuer l'énergie libre du système.

16°) La régularité de structure de la P.V.P., le nombre élevé de $=\text{N}-\text{CO}-$ disponibles et la liberté relative du groupement pyrrolidone sur la chaîne polyvinylique sont certainement à l'origine de la grande affinité de ce produit pour des tannoïdes d'origines très différentes.

Nous pensons que les nombreux résultats présentés dans ce travail constituent par leur originalité une base solide qui facilitera les recherches ultérieures sur les protéines végétales. Les techniques d'étude que nous avons élaborées constituent un outil maniable bien adapté par sa sensibilité à la résolution des problèmes en suspens, aussi bien en recherche fondamentale que dans les sciences appliquées, dans tous les domaines où interviennent simultanément substances protéiques et polyphénoliques, notamment en Brasserie et dans les autres industries de l'alimentation.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) URION E., CHOLLOT B. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Rome 1959, 45.
- (2) SCRIBAN R. — *Brass.*, **11**, 191 (1956).
- (3) WUHRER P. — *Bira e Malto*, 25 (1954).
- (4) HARTONG B.D. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Lucerne 1949, 56.
- (5) MENDLIK F. — *J. Inst. Brewing*, 134 (1950).
- (6) LHOEST W., LONTIE R., DE CLERCK J. — *Bull. assoc. anciens étu. Ecole Supér. Brass. Univ.*, Louvain, **49**, 121 (1953).
- (7) ALLOUF F., MUNIER F., MACHEBEUF M. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Nice 1953, 38.
- (8) BENGOUGH W.I., HARRIS G. — *J. Inst. Brew.*, 134 (1955).
- (9) HALL R.D., HARRIS G., RICKETTS R.W. — *J. Inst. Brewing*, 247 (1959).
- (10) LJUNGDAHL L., SANDEGREN E. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Baden-Baden 1955, 98.
- (11) HUDSON J.R. — *J. Inst. Brewing*, 127 (1955).
- (12) HUDSON J.R. — *J. Inst. Brewing*, 157 (1958).
- (13) DEBAISIEUX P. — *Bull. assoc. anciens étud. Ecole Supér. Brass. Univ.*, Louvain, **41**, 2 (1945).
- (14) HARTONG B.D., MASTENBROECK G.G.A., MENDLIK F. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Lucerne 1949, 250.
- (15) LUNDIN H. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Lucerne 1949, 229.
- (16) HELM E. — *J. Inst. Brewing*, 28 (1951).
- (17) SANDEGREN E., SOUMINEN H.S., EKSTROM D. — *Acta Chem. Scand.*, **3**, 1027 (1949).
- (18) SANDEGREN E. — *Abstr. Intern. Cong. Biochem.*, Cambridge, 545.
- (19) BISERTE G., SCRIBAN R., PICQUE M.T. — *Brass.*, **14**, 248 (1959).
- (20) GRABAR P. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Copenhagen 1957, 147.
- (21) LONTIE R., VOETS T.H. — *Bull. assoc. anciens étu. Ecole Supér. Brass. Univ.*, Louvain, **55**, 45 (1959).
- (22) DJURTOFT. — Communication au Troisième Colloque du groupe des Troubles de l'E. B. C. (Bruxelles 1960), non publié.
- (23) HARRIS G. and RICKETTS R.W. — *Chem. Ind.*, 686 (1959).
- (24) HARRIS G. — *J. Inst. Brewing*, 390 (1956).
- (25) HARRIS G., RICKETTS R.W. — *J. Inst. Brewing*, 22 (1958).
- (26) CURTIS H.S., CLARK A.G. — *J. Inst. Brewing*, 226 (1960).
- (27) HARRIS G., RICKETTS R.W. — *J. Inst. Brewing*, 256 (1959).
- (28) HARRIS G., RICKETTS R.W. — *J. Inst. Brewing*, 418 (1959).
- (29) BISERTE G., SCRIBAN R. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Nice 1953, 48.
- (30) KLECZKOWSKI A. — *Biochem. J.*, **40**, 677 (1946).

- (31) CLARK A. G. — *J. Inst. Brewing*, 321 (1960).
- (32) CERUTTI G. — *Birra e Malto*, 30 (feb. 1956).
- (33) FRUTON J. S. and SUMMONDS S. — *Gen Biochem New-York*, Wiley 1953, 58.
- (34) URION E., CHAPON L., CHAPON S., METCHE M. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Copenhagen 1957, 281.
- (35) HAUROWITZ F. — *Chem. Biol. of Proteins*. New-York : *Académie Press.*, 1950, 116.
- (36) HELM E. — *J. Inst. Brewing*, 379 (1936).
- (37) WALLERSTEIN J. S., HOLE M. G. and ALBA R. T. — *Wallerstein Lab. Commun.*, **11**, 105 (1948).
- (38) KNORR F. — *Schweiz. Brau. Rundschau*, **16**, 203 (1950).
- (39) CHAPON L., CHAPON S., URION E. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Rome 1959, 322.
- (40) BEATTIE G. B. — *Bottling*, 101 (July 1957).
- (41) CHAPON L., CHOLLOT B., URION E. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Vienne 1961, 319.
- (42) MARSHALL G. R. — *J. Sci. Food. Agr.*, **2**, 342 (1951).
- (43) SAINT-JOHNSTON J. H. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Lucerne 1949, 62.
- (44) ROBERTS E. A. H. — *J. Sci. Food Agr.*, **7**, 381 (1958).
- (45) BERTRAND G. — *Ann. Inst. Pasteur*, **18**, 116 (1904).
- (46) JANSEN H. E. — *J. Inst. Brewing*, 204 (1957).
- (47) MAC FARLANE W. D., WYE E., GRANT L. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Baden-Baden 1955, 298.
- (48) GUSTAVSON K. H. — *Svensk Kem. Tidskr.*, 359 (1954).
- (49) COHN E. J., EDSALL J. T. — *Proteins, amino-acids and peptids* Rheinhold. New-York 1943, 144.
- (50) HARRIS G. and RICKETTS R. W. — *J. Inst. Brewing*, 331 (1959).
- (51) STEVENS R. — *J. Inst. Brewing*, **66**, 470 (1960).
- (52) FREUDENBERG K. — *Bull. Soc. Chim.*, France, 1748 (1959).
- (53) LONTIE R., VANCRAENENBROECK R. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Copenhagen 1957, 11.
- (54) WYE E., MAC FARLANE W. D. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Copenhagen 1957, 299.
- (55) a) CHAPON L., CHAPON S., AIMÉ N., URION E. — *Bull. soc. chim.*, France, 81 (1959).
b) CHAPON S., CHAPON L., URION E. — *Bull. soc. chim.*, France 2012 (1960).¹
- (56) CHEVALIER P., CHOLLOT B., CHAPON L., URION E. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Vienne 1961, 246.
- (57) NAKAYAMA T. — *Amer. Soc. Brewing Chemists*, Proc. 61 (1961).

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Introduction	
I. — ORIGINE DE NOS TRAVAUX	1
II. — EXPOSÉ GÉNÉRAL BIBLIOGRAPHIQUE	4
A) Les faits - Définitions	4
B) Composition du trouble réversible	4
1. - Etude du facteur protéique	5
2. - Etude du facteur polyphénolique	6
C) Mécanisme de formation des troubles	7
1. - Aspect chimique	7
2. - Aspect physique	9
Première Partie	
EXPOSÉ DES RÉSULTATS FONDAMENTAUX ET DISCUSSION GÉNÉRALE	11
Nature des liaisons	13
Equilibres Protéines - Tannoïdes	
Etude des précurseurs polyphénoliques et de leurs transformations oxydatives	22
Deuxième Partie	
CHAPITRE I	
ETUDE DES TANNOIDES	
I. — Introduction à l'étude des Protéines et des Tannoïdes	33
II. — Degré de condensation des Tannoïdes et solubilité des Associations	34
1. - Tanins conduisant à la formation d'associations peu solubles ..	34
2. - Substances polyphénoliques simples conduisant à la formation d'associations de solubilité moyenne	39
3. - Tannoïdes des bières	39
4. - Produits d'oxydation des Tannoïdes	41
Interprétation	45
III. — Nature des Tannoïdes et solubilité des associations	46
1. - Préparation des solutions de polyphénols	46
2. - Oxydation peroxydasique des substances polyphénoliques simples ..	47
3. - Oxydation peroxydasique des substances polyphénoliques simples, en présence de constituants protéiques	48
IV. — Nature des Tannoïdes et pH optimum de formation d'associations insolubles	51
CHAPITRE II	
ETUDE DES PROTEINES DU TROUBLE	
I. — Rôle du facteur protéique	54
1. - Protéines des bières	54
2. - Protéines pures diverses	56

II. — Caractères du potentiel protéique	57
1. - Affinités des protéines pour les Tannoïdes	57
2. - Concentration des protéines	57
3. - Composition de la fraction protéique en acides aminés	59
4. - Poids moléculaire des protéines	59
a) Dialyse	59
b) Ultrafiltration	60
III. — Nature des Protéines et déplacement de l'équilibre P · T	61
1. - Protéines qui déplacent l'équilibre P · T dans le sens de la formation d'associations solubles	62
a) P.V.P. de bas poids moléculaire	62
b) Protéines pures	62
2. - Protéines qui déplacent l'équilibre P · T dans le sens de la formation d'associations insolubles	63
a) Protéines très solubles	64
b) Protéines peu solubles	64
c) Protéines insolubles	65
3. - Protéines qui déplacent l'équilibre par adsorption de T	66
a) Produits de synthèse	66
b) Protéines fibreuses	66
c) Protéines dénaturées par voie thermique	67
d) Levures	68
e) Isothermes d'adsorption	68
IV. — Nature des Protéines et pH optimum de formation d'associations P · T insolubles	70
1. - Protéines solubles formant avec la quercétine des associations solubles	71
2. - Protéines dont les associations avec la quercétine sont peu solubles	72
a) α globuline bovine et β globuline bovine	72
b) gluténine et édestine	75
V. — Caractère multifonctionnel des Tannoïdes et des Protéines	76
1. - Caractère multifonctionnel des Tannoïdes	76
2. - Caractère multifonctionnel des Protéines	76

Troisième Partie

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

I. — Appareillage	79
II. — Mesure de l'intensité des troubles. - Unités de trouble « Formazine » E. B. C.	80
III. — Mesure de la vitesse de formation des troubles	82
IV. — Dosage des Tannoïdes	84
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	85
BIBLIOGRAPHIE	88

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

SPECTRES ELECTRONIQUES DE MOLECULES POLYATOMIQUES
ET CONFIGURATION DES MOLECULES
DANS LEURS ETATS ELECTRONIQUES EXCITES

VU ET APPROUVÉ,

Nancy, le 15 février 1963.

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

M. ROUBAULT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER,

Nancy, le 15 février 1963.

Le Recteur,

Président du Conseil
de l'Université de Nancy

P. IMBS.

